

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE QUÍMICA
DOCTORADO EN QUÍMICA

“Estudio de la presencia de ocratoxina A en vinos uruguayos. ”

Ing Alim. Gabriela Garmendia
Director de Tesis: Dra. Silvana Vero

2011

Agradecimientos

A Silvana Vero, mi directora de tesis, por todo lo que he aprendido en estos años, por su apoyo constante e incondicional.

A los miembros el tribunal, por aceptar ser parte del mismo y tomarse el tiempo de leer la tesis.

A las fuentes de financiación de esta tesis: Beca LATU – Facultad de Química, Pedeciba, Proyectos PDT para jóvenes investigadores.

A la comisión de seguimiento de las Becas de posgrado Beca LATU – Facultad de Química, por ayudar a que esta beca saliera y se prorrogara.

A Alejandra Rodríguez, Polo Tecnológico de Pando por su ayuda.

A mis compañeros e Microbiología, por hacer que sea lindo ir a trabajar.

A mi madre, a Rodrigo, a Gonzalo y a la abuela Juanita por estar siempre.

A mi amor y compañero de vida, Manuel por el cariño de todos los días y por ser una pieza fundamental en el desarrollo y culminación de esta tesis. A Santi y Feli, nuestros pimpllos.

Resumen

La ocratoxina A (OTA), es una micotoxina que ha sido detectada en uvas y vinos. Es producida por *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus carbonarius* y especies pertenecientes al agregado *Aspergillus niger*. En los últimos años se ha descrito la presencia de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus japonicus* y *A. uvarum* en la superficie de uvas, presentando la dos primeras capacidad de producir OTA.

Se aislaron, identificaron y caracterizaron 57 cepas de *Aspergillus* pertenecientes a la Sección *Nigri*. Estas cepas fueron clasificadas por métodos fenotípicos y posteriormente identificadas a nivel de especie mediante un método de biología molecular basado en el RFLP del gen que codifica para la calmodulina, desarrollado en esta tesis. El 51 % fue identificado como *A. niger*, el 39 % como *A. uvarum*, 5 % como *A. tubingensis* -like y 5 % como *A. foetidus*. Ningún aislamiento de *A. carbonarius* fue obtenido. Las cepas fueron caracterizadas respecto a su capacidad de producir OTA en medio de cultivo y en uva Tannat y respecto a su sensibilidad a fungicidas de uso convencional para el control de *Botrytis*.

Debido a que no se obtuvieron aislamientos de *A. carbonarius* y a que esta especie ha sido descrita como la principal responsable de la presencia de OTA en uvas y vinos por su capacidad de producir altas concentraciones de OTA, se cree necesario un método más sensible que los métodos convencionales para detectar y cuantificar la presencia de *A. carbonarius* en uva. Para tal fin, se optimizó la técnica de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de esta especie en uvas de la variedad Tannat.

INTRODUCCIÓN.....	6
Ocratoxina A.....	8
Hongos productores de OTA.....	10
Factores que influyen en la producción de OTA.....	13
Factores que influyen la presencia de OTA en uvas.....	16
Presencia de OTA en vinos.....	19
Medidas correctivas para disminuir la presencia en OTA en vinos.....	19
Legislación.....	20
Características fisicoquímicas de la OTA.....	21
Métodos de extracción y purificación para la detección de OTA en uvas y vino.....	22
Métodos de identificación molecular de hongos.....	24
Algunas regiones génicas utilizadas para la identificación molecular de hongos.....	27
OBJETIVOS.....	30
Objetivo general.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Desarrollo de un método sencillo de biología molecular para la diferenciar las especies pertenecientes a la Sección <i>Nigri</i> del género <i>Aspergillus</i> descritas como contaminantes de uva.....	34
Métodos de extracción, purificación, detección y cuantificación de OTA.....	40
Preparación de la solución Stock de Ocratoxina A.....	41
Método de detección cualitativa de OTA.....	41
Método de cuantificación de OTA.....	41
Métodos de extracción de OTA de jugo de uva y vino de la variedad Tannat.....	42
Método de purificación alternativo.....	43
Aislamiento e identificación de cepas posibles productoras de ocratoxina A.....	44
Caracterización de las cepas pertenecientes a la Sección <i>Nigri</i> aisladas.....	49
Estudio de la capacidad de producir OTA en uva Tannat.....	51
Determinación <i>in vitro</i> de la sensibilidad a fungicidas de uso convencional.....	52
Cuantificación de <i>Aspergillus carbonarius</i> por PCR en tiempo real.....	54
Cepas utilizadas.....	55
Extracción de ADN.....	55
Puesta a punto de PCR en tiempo real para la cuantificación de <i>A. carbonarius</i>	55
Influencia de la matriz en la PCR en tiempo real.....	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
Desarrollo de un método sencillo de biología molecular para la diferenciar las especies pertenecientes a la Sección <i>Nigri</i> del género <i>Aspergillus</i> descritas como contaminantes de uva.....	60
Métodos de extracción, purificación, detección y cuantificación de OTA.....	73
Método de detección cualitativa de OTA.....	74
Métodos de extracción de OTA de jugo de uva y vino de la variedad Tannat.....	76
Método de purificación.....	77
Aislamiento e identificación de cepas posibles productoras de ocratoxina A.....	80
Caracterización de las cepas pertenecientes a la Sección <i>Nigri</i> aisladas.....	98
Estudio de la capacidad de producir OTA en medio de cultivo.....	99
Estudio de la capacidad de producir OTA en uva Tannat.....	102
Determinación <i>in vitro</i> de la sensibilidad a fungicidas de uso convencional.....	105
Cuantificación de <i>Aspergillus carbonarius</i> por PCR en tiempo real.....	109
Puesta a punto de PCR en tiempo real para la cuantificación de <i>A. carbonarius</i>	110
Influencia de la matriz la PCR en tiempo real.....	111
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	113
BIBLIOGRAFÍA.....	115
ANEXOS.....	127
Anexo 1.....	128
Buffer CTAB.....	129
CTAB solución de precipitación.....	129
NaCl 1.2M.....	129
NaOH 1M.....	130
ARNasa.....	130

Anexo 2.....	131
Anexo 3.....	134
Czapek Yeast Agar(CYA)	135
Yeast Sucrose agar (YES agar)	136
Anexo 4.....	137
Anexo 5.....	140
Anexo 6.....	143
Anexo 7.....	146

INTRODUCCIÓN

Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por hongos filamentosos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, provoca enfermedad o causa la muerte de animales y personas (Pitt y Hocking, 1997). Estos metabolitos son producidos principalmente por hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*.

Las micotoxinas contaminan principalmente alimentos de origen vegetal, como por ejemplo maní, almendras, nueces, manzanas, higos, uvas, cereales en general (Juan *et al.*, 2008; Teixeira de Magalhães *et al.*, 2011; Silverio *et al.*, 2010). El consumo de estos alimentos contaminados genera una micotoxicosis primaria.

También pueden estar presentes en alimentos de origen animal. Un ejemplo lo constituye la aflatoxina M1 (AFM1) (Pattono *et al.*, 2011; Dall'Asta *et al.*, 2008; Montagna *et al.*, 2008; López *et al.*, 2003). Esta micotoxina, puede llegar a ser contaminante de leche y sus derivados si el animal productor de leche, ingiere un alimento contaminado con la micotoxina aflatoxina B1 (López *et al.*, 2003). Si esto ocurre, la aflatoxina B1 (AFB1), clasificada como clase 1 (carcinogénico) por la IARC, es metabolizada en el organismo del animal a aflatoxina M1 y es secretada a través de la orina, heces y leche. Si bien esta toxina es menos tóxica que la AFB1, ha sido clasificada por la IARC como perteneciente al grupo 2B, posible carcinogénico (López *et al.*, 2003). El consumo de este tipo de alimentos contaminados genera una micotoxicosis secundaria.

Los efectos tóxicos de las micotoxinas pueden ser variados. Algunos, tales como la pérdida de apetito, la disminución de la eficiencia productiva en animales, la inmunosupresión, son inespecíficos y son más o menos generales para todas la micotoxicosis. Otros efectos, son específicos de la micotoxina de que se trate y pueden abarcar desde malestares digestivos hasta carcinogénesis. Los efectos causados por la ingestión de micotoxinas pueden ser agudos o crónicos. Los efectos agudos están relacionados con el consumo de altos niveles de la toxina en períodos cortos de tiempo, lo cual puede provocar incluso la muerte en pocas semanas (López de Cerain *et al.*, 2000; Santos Chona, 1999). Por el contrario, los

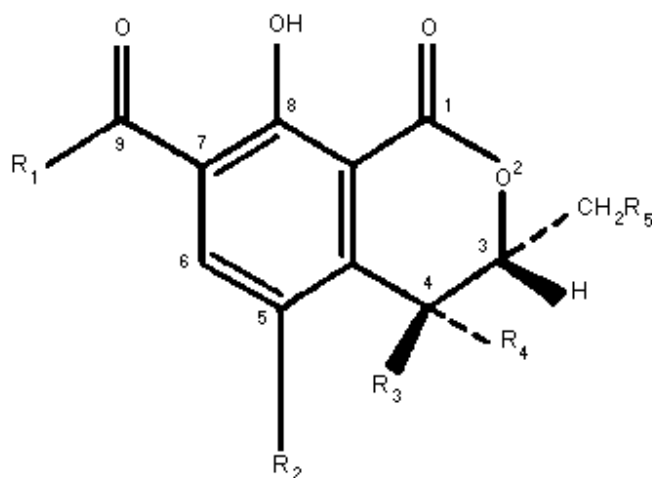
efectos crónicos producidos por las micotoxinas son los más comunes, ocurren cuando el hombre o los animales, debido a su dieta, están expuestos, a un consumo de cierta cantidad de toxina durante períodos prolongados de tiempo, induciendo efectos acumulativos (Santos Chona, 1999). Teniendo en cuenta que muchas micotoxinas son acumuladas en el organismo y su efecto es progresivo, se ha determinado la ingesta diaria tolerable para muchas de ellas. Este valor, se calcula en función de la contaminación estimada de los alimentos, del consumo promedio de los alimentos contaminados y de las cantidades de micotoxinas que provocan trastornos.

Particularmente la OTA, tiene efectos nefrotóxicos, carcinogénicos, teratogénicos e inmunosupresivos (López de Cerain et al, 2000). Ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) como perteneciente al grupo 2B (IARC, 1993), lo cual indica que es un metabolito posiblemente cancerígeno para humanos. En 1991, la JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), estableció la ingesta diaria tolerable en 16ng/kg de peso corporal /día. En 1998, debido a los efectos tóxicos de la OTA, el Comité de Científicos sobre Alimentos de la Unión Europea, estimó que la ingesta diaria tolerable debía estar por debajo de 5ng/Kg de peso corporal.

Ocratoxina A

Las ocratoxinas son un grupo de micotoxinas producidas principalmente por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. El grupo de las ocratoxinas está formado por ocratoxina A (OTA), ocratoxina B (OTB), ocratoxina C (OTC), ocratoxina α (OT α) y ocratoxina β (OT β), siendo la OTA la más tóxica para el ser humano (El Khoury y Atoui, 2010).

Químicamente, la ocratoxina A es un policétido derivado de la unión de una dihidroisocumarina y el aminoácido fenilalanina a través de una unión amida (Crespo-Sempere et al., 2010; El Khoury et al., 2010). La OTB es el derivado no clorado de la OTA, mientras que la OTC es el éster de la OTA. La OT α y la OT β son productos de la hidrólisis de la OTA y no presentan la molécula de fenilalanina (El Khoury y Atoui, 2010). En la figura 1 se puede observar la estructura química de cada metabolito.



R1	R2	R3	R4	R5	
Fenilalanina	Cl	H	H	H	Ocratoxina A
Fenilalanina	H	H	H	H	Ocratoxina B
Fenilalanina, etil ester	Cl	H	H	H	Ocratoxina C
OH	Cl	H	H	H	Ocratoxina α
OH	H	H	H	H	Ocratoxina β

Figura 1. Estructura química de ocratoxinas

La OTA ha sido detectada en bebidas y alimentos como por ejemplo cerveza, cocoa, café, cereales y derivados y legumbres (Serra y Bonhevi, 2004; Vatinno *et al*, 2008; Mateo *et al*, 2007; Juan *et al* 2008). Ha sido encontrada también en uvas y vinos producidos en países europeos (Sage *et al.*, 2004; Bellí *et al.*, 2006; Pietri *et al.*, 2001; Serra *et al.*, 2006; Berente *et al.*, 2005), oceánicos (Leong *et al.*, 2006a; Leong *et al.*, 2006b) y sudamericanos (Battilani *et al.*, 2006; Chulze *et al.*, 2006; Ponsone *et al.*, 2007, Diaz *et al.*, 2009, Chiotta *et al.*, 2009).

La ocratoxina A se asoció a la Nefropatía Endémica de los Balcanes (López de Cerain *et al.*, 2000), que fue descrita por primera vez en la década del 50. Se trata de una insuficiencia renal crónica en habitantes de zonas rurales de la Península Balcánica, formada hoy por Croacia, Bosnia - Herzegovina, Serbia, Montenegro, Macedonia, Albania, Rumania, Bulgaria y Grecia. Luego de haber estudiado varias posibilidades, la OTA fue determinada como responsable de la nefropatía al ser los síntomas experimentados por los afectados muy

similares a los correspondientes a la nefropatía porcina, la cual también es causada por OTA (López de Cerain *et al.*, 2000) y a los altos niveles de estas toxinas que se detectaron en plasma, orina y alimentos de las personas afectadas (López de Cerain *et al.*, 2002; El Khoury y Atoui, 2010).

Su principal mecanismo de acción es la inhibición de síntesis proteica. Compite con la fenilalanina en la unión con el ARN de transferencia, provocando la carencia de determinadas enzimas. (López de Cerain *et al.*, 2000). Dirheimer y Creppy (1991) demostraron que la OTA inhibe la síntesis proteica en bacterias, levaduras, células de mamífero *in vitro* y animales *in vivo*. Se cree que dicha inhibición puede deberse a una restricción de la elongación de péptidos debido a la competencia con el aminoácido fenilalanina en la reacción catalizada por la enzima tRNA- fenilalanina sintetasa. Esta hipótesis fue demostrada al revertirse la inhibición con el agregado de fenilalanina al medio (Schilter *et al.*, 2005).

Hongos productores de OTA

La ocratoxina A es producida por especies del género *Aspergillus* y *Penicillium*. Fue detectada por primera vez en cereales y su contaminación fue asociada a la presencia de *A. ochraceus*. De allí el nombre ocratoxina.

La OTA es producida principalmente por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* (Ostenfeld *et al.*, 2001; Abarca *et al.*, 2004) y por especies biseriadas de *Aspergillus* pertenecientes a la Sección *Nigri*, dentro de las cuales se encuentran *Aspergillus carbonarius* y cepas del agregado *Aspergillus niger* (Ponsone *et al.*, 2007). Estas especies del género *Aspergillus*, pertenecientes a la Sección *Nigri*, están asociadas a la presencia de OTA en uvas. A su vez, recientemente se han detectado cepas de *Aspergillus japonicus* y *Aspergillus aculeatus*, especies monoseriadas de la Sección *Nigri*, aisladas de uva, capaces de producir OTA (Ponsone *et al.*, 2007). Sin embargo, se puede afirmar que las cepas de la especie *A. carbonarius* son las principales causantes de la presencia de OTA en vinos debido a su capacidad de producir altas concentraciones de esta toxina en uva (Bau *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2006).

Aspergillus carbonarius

A. carbonarius se considera una de las especies más fácilmente distinguibles de la Sección debido al tamaño y ornamento de sus conidios (Abarca *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2007). La identificación de cepas de *A. carbonarius*, puede realizarse fenotípicamente (Pitt y Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2007) de acuerdo a características microscópicas de los conidios y a la velocidad de crecimiento en diferentes medios de cultivo a diferentes temperaturas de incubación. Esta identidad puede ser confirmada por métodos genotípicos mediante, por ejemplo, secuenciación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2.

Es la especie potencialmente más peligrosa debido a las altas concentraciones de OTA que puede producir. Dependiendo de la cepa es capaz de producir, en condiciones de laboratorio, entre 1.2 y 220 ppm (Bau *et al.*, 2006; Esteban *et al.*, 2004).

El agregado Aspergillus niger

El agregado *A. niger* está formado por cuatro especies, *A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis* y *A. brasiliensis*, siendo su diferenciación morfológica muy dificultosa (Abarca *et al.*, 2004). La identificación a nivel de especie de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* se debe realizar mediante técnicas de biología molecular, como por ejemplo secuenciación. Bau *et al.* (2006) desarrollaron un método basado en el RFLP de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2, en el cual de acuerdo a los perfiles obtenidos para cada cepa, éstas se pueden clasificar en pertenecientes al grupo N o T (Bau *et al.*, 2006). El grupo N está formado por las especies *A. niger*, *A. foetidus*, mientras que el grupo T está formado por las especies *A. tubingensis*, y *A. brasiliensis* (Abarca *et al.*, 2004). La diferenciación entre grupo N y grupo T es importante ya que todas las especies pertenecientes al grupo N son productoras de OTA (Esteban *et al.*, 2004), mientras que se suponía que las pertenecientes al grupo T, no lo eran. En el año 2007, Martínez Culebras y Ramón (2007) describieron un grupo de cepas clasificadas como pertenecientes al grupo T y productoras de OTA, a las cuales denominaron *A. tubingensis*-like.

En general, las cepas del agregado *A. niger* son capaces de producir en medio de cultivo, en condiciones similares a las establecidas para la producción de *A. carbonarius*, cantidades de OTA bastante menores, en el rango de 0.1 – 25 ppm. (Esteban *et al.*, 2004).

Especies monoseriadas de la Sección Nigri

Hasta el año 2008, las especies *Aspergillus japonicus* y *Aspergillus aculeatus* eran las únicas monoseriadas de la Sección *Nigri*. Ese año, Perrone *et al.* (2008) describieron una nueva especie, monoseriada, a la cual denominaron *Aspergillus uvarum*. Esta especie se diferencia fenotípicamente de las otras dos en que su velocidad de crecimiento es menor a 35°C en el medio de cultivo Czapek Yeast Agar (CYA). A su vez, la secuencia de los genes que codifican para la calmodulina y la β -tubulina se diferencian en un 5% y 4% respectivamente de los correspondientes a las especies anteriores, las cuales, a su vez, difieren entre sí en un porcentaje similar de pares de bases.

La identificación primaria de las tres especies mencionadas se realiza mediante observación microscópica de las hifas conidióforas. Es característica la ausencia de métula en la hifa conidiófora, por la cual se las clasifica como monoseriadas. En la figura 2 se muestra una cepa monoseriada en comparación con una biseriada.

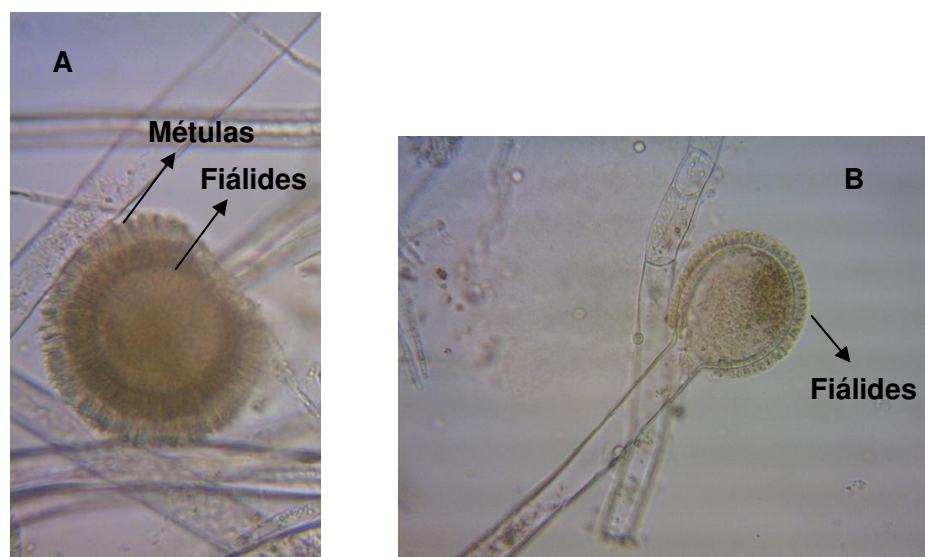


Figura 2. A. Cepa biseriada. B. Cepa monoseriadas.

La identificación a nivel de especie es muy difícil de realizar por métodos fenotípicos (Abarca *et al.*, 2004), ya que la misma se basa principalmente en la diferencia de extrólitos producidos (Abarca *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2007), por lo que se recurre a métodos de biología molecular.

Existe una gran controversia con respecto a la capacidad de producir OTA por parte de las especies monoseriadas de la Sección. Ponsone *et al.* (2007) describieron la capacidad de producir OTA de sus aislamientos de *A. japonicus*, mientras que Chiotta *et al.* (2009), determinaron que ninguno de sus aislamientos de *A. japonicus* eran capaces de producir OTA en condiciones de laboratorio. En el trabajo de Oliveri *et al.* (2008), queda demostrada la dependencia de la cepa con respecto a la capacidad de producir OTA. En este trabajo se aislaron tres cepas de *A. japonicus* de uvas italianas, de las cuales sólo una fue capaz de producir la toxina. En cualquier caso, las cantidades de OTA producidas por cepas de esta especie, en condiciones de laboratorio, similares a las condiciones de producción de *A. carbonarius* y al agregado *A. niger*, han sido muy bajas y se encuentran en el orden de ppb (Ponsone *et al.*, 2007). No existen hasta el momento, datos en bibliografía respecto a la capacidad de producción de OTA de cepas de *A. uvarum* en condiciones de laboratorio ni en uva.

Factores que influyen en la producción de OTA

Existen diversos factores que influyen en la producción de micotoxinas. Algunos de ellos son inherentes al hongo, como por ejemplo, su base genética (Gallo *et al.*, 2009; Esteban *et al.*, 2004), y otros son extrínsecos, dentro de los cuales, las condiciones ambientales, tienen un rol preponderante. Dentro de las condiciones ambientales, en el caso de la ocratoxina A, el sustrato, la actividad de agua, el pH y la temperatura han sido los principales factores estudiados (García *et al.*, 2010; Tassou *et al.*, 2007), resultando en algunos casos en el desarrollo de modelos estadísticos predictivos de la producción en micotoxinas y particularmente de OTA (García *et al.*, 2010).

Sustrato

La producción de micotoxinas está muy ligada al sustrato. Diferencias físicas y químicas del sustrato, la disponibilidad de agua, el contenido de azúcares, proteínas o aminoácidos o las trazas de minerales pueden influir en la producción de OTA y otras micotoxinas (Jackson *et al.*, 2008; Kokkonen *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2008).

Diferentes estudios se han realizado, sobre medios de cultivo, con el fin de establecer condiciones favorables para la producción de OTA por parte de las especies de la Sección *Nigri*. Como ejemplos se pueden citar el medio de cultivo denominado “símil jugo de uva” (Bellí *et al.*, 2004; Bellí *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2004), que es un medio sintético que asemeja la composición del jugo de uva; el medio Czapek Yeast Agar (CYA) (Bragulat *et al.*, 2001.; Esteban *et al.*, 2006a) y el medio Yeast Extract Sucrose (YES) agar (Esteban *et al.*, 2006b). El medio YES resultó ser el medio más adecuado para la producción de OTA por especies del agregado *A. niger*, mientras que en CYA se obtuvieron los mayores niveles de OTA por parte de *A. carbonarius* (Esteban *et al.*, 2006a; Esteban *et al.*, 2006b). En ningún caso, la máxima producción se obtuvo en el medio símil jugo de uva.

El tiempo de incubación también condiciona la producción de micotoxinas. Con respecto a la OTA, se pueden detectar niveles altos de OTA a los 7 – 10 días de incubación (Esteban *et al.*, 2004). Luego de este período, los niveles de OTA descienden debido a que la micotoxina ingresa a la célula cuando algunas fuentes de nitrógeno se agotan en el medio (Terén *et al.*, 1996).

La actividad del agua es un concepto termodinámico que describe el grado en que está ligada en el producto y por lo tanto, su habilidad de actuar como solvente y participar en reacciones químicas y bioquímicas y en el crecimiento microbiano (Fennema, 1985). Es uno de los factores más influyentes en el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas en alimentos. Sin embargo, los valores óptimos para el crecimiento, en general, no coinciden con los valores óptimos de producción de micotoxinas.

Bellí *et al.* (2004a) y Bellí *et al.* (2004b) determinaron que el rango de actividad de agua para el crecimiento de *A. carbonarius* es 0.88-0.99, mientras que se determinó que para la

producción de OTA en medio de cultivo símil jugo de uva, el rango de actividad de agua debía estar entre 0.95 – 0.99, siendo máxima a 0.99. Un resultado similar, tanto para el crecimiento como la producción, obtuvieron Esteban *et al.* (2006a) y Esteban *et al.* (2006b) en medio YES agar y CYA para especies del agregado *A. niger* y *A. carbonarius* respectivamente.

El pH, también es un factor influyente en el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. Sin embargo, su influencia no es tan determinante como la de los factores mencionados anteriormente. Estaban *et al.* (2006c) y Esteban *et al.* (2005) determinaron que tanto las especies del agregado *A. niger* como *A. carbonarius* fueron capaces de producir OTA en YES agar y CYA, respectivamente, en el rango de pH comprendido entre 2 y 10.

Temperatura

La temperatura es otro uno de los factores influyentes en el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas.

En general, las especies productoras del género *Penicillium*, son capaces de producir OTA a temperaturas inferiores que las especies productoras del género *Aspergillus* (Pitt y Hocking, 1997). Este hecho explica que la producción de OTA en climas más fríos esté asociada a *Penicillium*, en especial a *P. verrucosum*, mientras que en zonas mas cálidas, la producción de OTA está asociada a *Aspergillus* (Battilani *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2003).

El rango de temperatura de crecimiento para las especies del agregado *A. niger* y *A. carbonarius* es amplio, de 10- 40°C (Esteban *et al.*, 2004). Sin embargo, el rango de temperatura en el que se produce OTA es menor. En el caso de *A. carbonarius*, Bellí *et al.* (2005), determinaron que la temperatura óptima de producción de OTA en medio símil jugo de uva fue 15-20°C. Esteban *et al.* (2006a) y Esteban *et al.* (2004) determinaron que si bien el rango de producción de OTA en CYA y YES agar por parte de *A. carbonarius* y especies del agregado *A. niger*, respectivamente, es entre 15°C y 30°C, la producción máxima se produce a los 15°C en un tiempo de incubación de 10 días.

Los resultados obtenidos hasta el momento, indican que las condiciones óptimas de producción de OTA *in vitro*, por parte de *Aspergillus* de la Sección *Nigri*, varían con la especie (Esteban *et al.*, 2006a; Esteban *et al.*, 2006b). Dichas condiciones se exponen en la tabla 1.

Especie	Medio de cultivo	Temperatura	Tiempo de incubación
<i>A. carbonarius</i>	CYA	15-16°C	10 días
Agregado <i>A. niger</i>	YES	15-16°C	6 días

Tabla 1. Condiciones óptimas de producción de OTA

En dichas condiciones se pueden obtener concentraciones de OTA del orden de ppm en ambos casos (Esteban *et al.*, 2006a; Esteban *et al.*, 2006b), lo cual facilita la detección o cuantificación de la toxina. Es por ello que numerosos trabajos determinan el potencial ocratoxigénico de los aislamientos en dichas condiciones de cultivo.

La producción de OTA en uva es siempre menor que la alcanzada en los medios de cultivo mencionados. Díaz *et al.* (2009), ensayaron la capacidad de producir OTA en uvas de la variedad Cabernet Sauvignon de una cepas de *A. niger* y una de *A. carbonarius*. La producción alcanzó la concentración de 0.14 y 1 ppb respectivamente.

En diversos trabajos se ha estudiado la presencia de especies ocratoxigénicas y la presencia de OTA en uvas de diversas variedades, dentro de las cuales se encuentran Cabernet Sauvignon (Díaz *et al.*, 2009; Bau *et al.*, 2004), Moscatel (Bau *et al.*, 2004), Bonarda (Ponsone *et al.*, 2007), Tempranillo (Ponsone *et al.*, 2007) y Riesling (Torelli *et al.*, 2006). La uva de la variedad Tannat, no ha sido estudiada aún.

Factores que influyen la presencia de OTA en uvas

La presencia de ocratoxina A en uvas es un problema que se origina en el viñedo. Las cepas de la Sección *Nigri*, potenciales productoras de OTA, están presentes en el viñedo desde etapas muy tempranas del desarrollo de las bayas (Battilani *et al.*, 2006). En estudios realizados por Leong *et al.* (2006a), se ha determinado que el suelo y los residuos de la viña en el mismo son los principales reservorios de propágulos de estas cepas. Se postula que las

esporas presentes en el suelo son trasladados por el aire y depositados en la superficie de las bayas (Leong *et al.*, 2006b).

Es posible controlar la presencia de *A. carbonarius* en el suelo mediante técnicas de manejo de viñedo. De acuerdo a Leong *et al.* (2006b), la presencia de *A. carbonarius* es mayor en el suelo de aquellos viñedos que realizan labranza de la entrefila. En aquellos suelos menos perturbados, *A. carbonarius* se encuentra dentro de un equilibrio y regulado por toda la flora presente y asociada a la cobertura de la entrefila.

La temperatura del suelo es un factor que puede controlar la incidencia de *A. carbonarius* en el suelo (Leong *et al.*, 2006a). Varios trabajos determinaron la temperatura óptima de crecimiento, la temperatura mínima y la temperatura máxima de crecimiento de la especie. A temperaturas mayores de 35°C, la velocidad de crecimiento descende, siendo cero a 40°C (Esteban *et al.*, 2004).

Sin embargo, el principal factor que determina la presencia de ocratoxina A en uvas es la presencia de daño físico en las bayas. Se ha determinado que aunque en la superficie de las bayas estén presentes cepas potenciales productoras de OTA, si no hay daño físico, no hay producción de OTA en uvas (Leong *et al.*, 2006a). Para el desarrollo de síntomas de la presencia de *Aspergillus* y de OTA, es necesario, tanto la presencia de cepas potenciales productoras de OTA como la presencia de heridas en las bayas. Estas heridas pueden ser producidas por pájaros, insectos, por infección de otros hongos como son *Botrytis cinerea* o *Erysiphe necator* o por lluvia previo a la cosecha (Leong *et al.*, 2006a), donde la diferencia de presión osmótica hace que ingresen grandes cantidades de agua a las bayas y el hollejo se rompa.

Algunas variedades son más susceptibles al ataque por *Aspergillus*. Leong *et al.* (2006a) explican esto de acuerdo a la diferencia en la estructura del racimo. Racimos más compactos, retienen una mayor proporción de esporas y la probabilidad de incidencia de la enfermedad es mayor.

La maduración de las bayas es un factor determinante en el desarrollo de síntomas de enfermedad por *Aspergillus*. Leong *et al.* (2006b) demostraron que en etapas tempranas de

las bayas, previo al envero, las esporas de *Aspergillus* no sobreviven en la superficie de la baya. Esto puede explicarse por la exposición prolongada a los rayos UV, sumado a que en esta etapa del desarrollo, la piel es dura y en caso de haber heridas, la acidez de la baya es alta. El desarrollo de la enfermedad es más rápido a medida que aumenta la madurez (Leong *et al.*, 2006).

Durante todo el ciclo evolutivo de la viña, se realizan diversos tratamientos fitosanitarios destinados a la prevención y cura de diversas enfermedades. En el momento de mayor madurez y cercano a la cosecha, los tratamientos que se realizan apuntan al control de *Botrytis*, principalmente, mientras que ninguno de los fungicidas utilizados es específico para el control de *Aspergillus*. Dado que, por lo expuesto, en los estudios realizados por Leong *et al.* (2006a) y Leong *et al.* (2006b) la mayor incidencia de la enfermedad producida por *Aspergillus* se produce en los momentos cercanos a la madurez de la baya, se podría decir que de todos los fitosanitarios utilizados, los que deberían ser eficaces para el control de *Aspergillus*, deberían ser los utilizados en este momento.

Algunos de los fungicidas utilizados en esta etapa son iprodione, procymidone y pirimetanil. Los dos primeros son dicarboximidas y son utilizados en varios cultivos para proteger contra *Botrytis cinerea*, *Monilinia* spp. y *Sclerotinia* spp (Yamaguchi y Fujimura, 2005). El exacto modo de acción de estos fungicidas no se conoce, sin embargo se supone que interfieren con el mecanismo de respuesta del hongo a un aumento de presión osmótica extracelular. En respuesta a un aumento de presión osmótica exterior, los hongos acumulan solutos compatibles como glicerol dentro de sus células para aumentar la presión osmótica interna (Cui *et al.*, 2002). Las dicarboximidas actúan estimulando la síntesis de glicerol, aún en condiciones de baja presión osmótica exterior. Esto provoca un incremento de la presión osmótica interna con la consiguiente la entrada de agua, lo cual puede llevar a la lisis celular (Cui *et al.*, 2002). Las cepas resistentes a estos fungicidas no producen un aumento del glicerol intracelular, en presencia de los mismos, pero tampoco lo hacen como respuesta al stress osmótico causado por un aumento de la concentración extracelular de solutos. Debido a ello, los aislamientos resistentes tienen baja tolerancia a ambientes con elevada presión osmótica (Ochiai *et al.*, 2001). El pirimetanil, se encuentra dentro del grupo de las

anilino pirimidinas (Gepp *et al.*, 2011). Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de la metionina, afectando la síntesis proteica.

Presencia de OTA en vinos

El proceso de vinificación se puede clasificar en vinificación en tinto o vinificación en blanco. El proceso de vinificación en tinto involucra una etapa de maceración del hollejo y fermentación alcohólica, durante la cual el azúcar presente en las uvas es metabolizada por levaduras a alcohol. Posteriormente, mediante un prensado se separa el hollejo del vino. Las levaduras utilizadas en este proceso pueden ser nativas o comerciales. En el caso de la vinificación en blanco, primero se separa el hollejo de la pulpa, y luego se lleva a cabo la fermentación alcohólica. Dado que la contaminación fúngica productora de OTA se encuentra a nivel de la cáscara, y en función del proceso tecnológico de elaboración, los vinos vinificados en blanco presentan menores concentraciones de OTA que los vinos vinificados en tinto (Ottender *et al.*, 2000). Leong *et al.* (2006a) proponen dos motivos por los cuales se explica esta diferencia. En primer lugar, previo a la fermentación, los vinos vinificados en blanco tienen una clarificación adicional respecto a los vinos vinificados en tinto. En segundo lugar, de acuerdo a las características fisicoquímicas de la ocratoxina A, en las condiciones en las cuales se lleva a cabo la fermentación, que medio es ácido y un medio en el cual la cantidad de alcohol va aumentando durante la fermentación, se ve favorecida la extracción de la toxina del hollejo. Es por esto que los vinos vinificados en tinto presentan mayores niveles de ocratoxina A que los vinos vinificados en blanco.

Medidas correctivas para disminuir la presencia en OTA en vinos

Existen trabajos que prueban la reducción de la toxina en vinos por el agregado de adsorbentes. Costa Alves, (2002) afirma que el agregado de carbón activado disminuye un 90% el contenido de OTA en vinos contaminados, mientras que una mezcla de gelatina y sílica gel logra una reducción del 50%. Por otro lado, Bejaoui *et al.*, (2004) estableció que el agregado de levaduras inactivadas por calor reduce el nivel de OTA en un 75%. Se ha visto también que durante la maceración y fermentación alcohólica hay un aumento del nivel de OTA (Rousseau, 2004), mientras que luego de la fermentación alcohólica la concentración de

OTA en el mosto puede ser reducida hasta en un 70%, principalmente por un proceso de adsorción de ocratoxina A en la paredes de la levaduras y no por metabolización del misma (Cecchini *et al.*, 2005).

Legislación

En Uruguay, el nivel de OTA en vinos aún no es controlado en forma reglamentaria. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) estableció un límite máximo permitido que entró en vigencia en febrero de 2005. El límite máximo de esta toxina en vinos es de 2 ppb (Resolución CST 1/2002)

Análisis de micotoxinas presentes en alimentos

La detección de micotoxinas puede derivar en resultados con una alta variabilidad, debida a tres factores principales: la toma de muestra, la preparación de la muestra y el método de análisis.

La toma de muestra es muy importante. Por lo general se parte de un lote, del cual se debe obtener una muestra representativa. El objetivo es poder determinar, a partir de esa muestra, la concentración promedio de la toxina en el lote. El problema que se presenta, es que en la mayoría de los casos, sobre sustratos sólidos, la micotoxina está distribuida en forma heterogénea en todo el lote. Por ejemplo, en un silo de almacenamiento de granos, la contaminación puede estar en un foco puntual, donde la concentración de micotoxinas es muy elevada con respecto al resto del lote. Lo mismo ocurre en las uvas, donde la contaminación por OTA puede ser puntual en una parte del racimo.

La preparación de la muestra y el método de análisis están condicionados por el nivel de toxina a determinar. Las micotoxinas se encuentran en general en el orden de partes por millón (ppm), o lo que es lo mismo microgramos por gramo de muestra; o partes por billón (ppb), o sea, microgramos por quilogramo de muestra. Una vez obtenida la muestra, la toxina debe ser extraída y el extracto debe ser purificado para evitar interferencias en la detección o cuantificación final. Estas etapas deben ser optimizadas de forma de evitar pérdidas de la toxina, la cual se encuentra en general en muy baja concentración. A su vez, el método

analítico elegido debe ser suficientemente sensible como para lograr detectar los niveles de micotoxina mencionados.

La extracción de la micotoxina se realiza con solventes que presenten afinidad con la misma. En caso de partir de una muestra sólida, luego de la extracción, se separa el sólido remanente por centrifugación o filtración. En caso de partir de una muestra líquida, el solvente de extracción debe ser inmiscible con la muestra y la separación de los líquidos se realiza mediante bola de decantación. En cualquiera de los casos se obtiene una muestra líquida, en general un solvente orgánico, conteniendo la micotoxina. En este punto se puede realizar una determinación de la toxina por TLC. En la mayoría de los casos, previo a la cuantificación, se debe realizar una purificación. Para este paso se recurre, generalmente, a opciones comerciales como son columnas de inmunoafinidad o columnas de adsorción en fase sólida. Luego de la purificación, el extracto obtenido es cuantificado, por ejemplo, por HPLC.

La etapa de extracción de la toxina de la muestra es una etapa clave del método de análisis. Para diseñar el método de extracción de la micotoxina de la matriz en estudio, es muy importante conocer las características fisicoquímicas de la misma. De esta forma se pueden optimizar las condiciones de extracción de forma que el porcentaje de recuperación del método sea lo más alto posible.

Características fisicoquímicas de la OTA

La ocratoxina A es un ácido débil, cuyo pKa es 7.1 y su peso molecular 403.8g/mol. La molécula genera fluorescencia bajo luz UV. La fluorescencia es de color verde en caso de estar presente en medio levemente ácido mientras que es azul en caso de estar presente en medio alcalino (El Khoury y Atoui, 2010).

En medio ácido y pH neutro, la OTA se encuentra sin carga y es soluble en solventes orgánicos (alcoholes, cloroformo, cetonas), muy poco soluble en agua e insoluble en éter de petróleo e hidrocarburos saturados. En condiciones alcalinas, la molécula es soluble en soluciones acuosas de bicarbonato de sodio y soluciones alcalinas en general (El Khoury y Atoui, 2010).

La ocratoxina A es muy estable. Es resistente a altas temperaturas y acidez. Es por este motivo que si un alimento se encuentra contaminado, será muy difícil detoxificarlo totalmente (El Khoury y Atoui, 2010).

Métodos de extracción y purificación para la detección de OTA en uvas y vino.

El método más comúnmente utilizado para la extracción de OTA de uvas y vino es una extracción líquido - líquido con cloroformo. Este método requiere una acidificación previa hasta pH 2, dado que en esas condiciones la ocratoxina A se encuentra sin carga y es soluble en solventes orgánicos como el cloroformo (Saez *et al.*, 2004). Luego de la extracción, se obtiene un extracto clorofórmico conteniendo la OTA en solución. Generalmente, el solvente se evapora a sequedad y se resuspende el producto en un disolvente adecuado, de acuerdo a los pasos a seguir. Saez *et al.* (2004) no realizan purificación posterior del extracto, por lo que el mismo es cuantificado por HPLC con detector de fluorescencia..

El método de purificación más utilizado y recomendado es la utilización de columnas de inmunoafinidad. En el caso de la ocratoxina A, se recomienda la utilización de las columnas OchraTest immunoaffinity column (Vicom Science technology, Watertown, MA. USA) (Saez *et al.*, 2004; Visconti *et al.*, 1999). Este método requiere una etapa previa de alcalinización de la muestra con bicarbonato de sodio. En estas condiciones, la ocratoxina A se adhiere a los anticuerpos específicos presentes en la columna y luego se eluye con un solvente adecuado, por ejemplo, metanol. Las ventajas que presenta este método es que es específico para la ocratoxina A y no es necesaria la extracción previa con cloroformo. Tiene la desventaja de su alto costo sumado a que las columnas no son reutilizables.

Una alternativa a las columnas de inmunoafinidad es la utilización de columnas de C18. Las recomendadas por Sáez *et al.* (2004) y Tessini *et al.* (2010) son las C18 de la marca Waters, Milford, MA, USA. Ambos métodos de purificación han sido incorporados a métodos de análisis con los cuales se han logrado límites de detección menores a 0.1 ppb de OTA. Por lo tanto su utilización para el análisis de vinos es válida, ya que el límite máximo permitido por la OIV es de 2 ppb.

Métodos de cuantificación de OTA

La detección y cuantificación de la ocratoxina A se puede realizar mediante inmunoensayos, como es el caso de ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) (El Khoury y Atoui, 2010). Este método es muy específico ya que se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, con un posterior desarrollo de color. Otra ventaja que presenta es la rapidez del método, ya que en menos de una hora se puede analizar un alto número de muestras. Su desventaja es su alto costo, los kits son importados, en nuestro país tienen un tiempo de espera de treinta días y no son reusables.

Como métodos alternativos se encuentran la cromatografía de capa fina (TLC) y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Tanto TLC como HPLC, no son métodos específicos para la ocratoxina A y, al igual que un kit de ELISA, requieren una curva de calibración. TLC es un método muy útil para una determinación rápida y cualitativa. Puede ser utilizado para cuantificar, pero en ese caso de requiere la utilización de un scanner. HPLC requiere el uso de aparatos un poco más sofisticados y personal entrenado, pero es muy útil para cuantificación y análisis de rutina.

En el caso de la ocratoxina A, la AOAC describe el método para la detección o cuantificación de OTA en cebada mediante TLC (973.37) y HPLC (991.44), en maíz mediante HPLC (991.44) y en café verde mediante TLC (975.38). En todos los casos, el método comienza por una extracción de la toxina con cloroformo en medio ácido. En el caso de la TLC, se utiliza sílica como adsorbente y una fase móvil ácida. La detección es visual, por fluorescencia de color verde cuando se expone la placa a UV. La detección es confirmada por pasaje a color azul por exposición a vapores de amoníaco. En el caso de HPLC, los componentes de la muestra son separados a través de una columna de C18 y una fase móvil ácida. La detección se hace con un detector de fluorescencia.

En el caso particular de la determinación de OTA en vinos, La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), en la Resolución OENO 16/2001, recomienda un método para la cuantificación de OTA en vinos blancos, rosados y tintos. Este método comienza con una alcalinización del vino y posterior purificación en columnas de

inmunoafinidad. La detección y cuantificación se hace mediante HPLC con detector de fluorescencia.

Métodos de identificación molecular de hongos

Las herramientas moleculares utilizadas para identificar han cambiado con el tiempo, y por lo tanto los parámetros para determinar si dos cepas pertenecen a la misma especie han ido avanzando.

Hibridación ADN-ADN

La definición aceptada a la fecha se basa en la hibridación total del ADN de la cepa a identificar con el ADN de una cepa de referencia. Para hongos, se acepta que dos cepas pertenecen a la misma especie, si sus genomas se asocian en más de un 80% (Vilgalys, 1988).

Este análisis tiene bastantes inconvenientes. El resultado depende de la metodología usada y dado que se basa en la comparación de la cepa problema con una cepa de referencia, se realiza solamente para confirmar o rechazar una identificación. Además este análisis algunos laboratorios y tiene costos elevados

Secuenciación

Existen otras técnicas moleculares relativamente más sencillas que permiten la identificación de un microorganismo aunque no con la certeza que brinda la hibridación de ADN. La secuenciación de determinados genes o zonas genómicas que son cronómetros evolutivos permite no sólo identificar un microorganismo aislado, sino también determinar cuáles son las especies filogenéticamente más relacionadas a él. La secuencia obtenida se compara luego (mediante un software) con secuencias depositadas en bancos de datos. De ese análisis surgen las secuencias más similares a la secuencia problema. El resultado del análisis muestra también el grado de similitud entre ellas.

Los genes o regiones génicas deben tener determinadas características para considerarse cronómetros evolutivos:

- no deben ser transferidos horizontalmente, es decir, no pueden transmitirse de una especie a otra.
- deben codificar para moléculas fundamentales de la célula (ej. ARN ribosomal)
- deben tener un tamaño suficientemente grande para tener un buen número de datos a comparar pero no demasiado grande de forma que implique un gran esfuerzo de análisis.
- deben presentar zonas conservadas que permitan el anclaje de primers no específicos para su amplificación y variables que permitan detectar diferencias entre especies.

Además, cuando se elige un gen para utilizarlo en identificación, se debe tener en cuenta que existan secuencias de ese gen ya depositadas en bancos de datos, de forma tal que sea posible la comparación.

Para el caso de especies relacionadas es importante determinar que los genes a utilizar en la identificación sean suficientemente diferentes. Dependiendo de los géneros de hongos a identificar existen, en algunos casos, hay determinadas secuencias recomendadas para la identificación de las especies. Por ejemplo, para la identificación de especies dentro del género *Fusarium* y *Trichoderma* se utilizan diferentes regiones del gen que codifica para el factor de elongación 1 α (tef1 α). Es así que existen bases de datos de estas secuencias específicas para estos géneros, utilizadas para la identificación de especies. Estos bancos de datos están disponibles *on line* (<http://www.isth/tools/blast>).

No existen valores establecidos de similitud de secuencias para decidir que un aislamiento fúngico pertenece o no a una especie. En el caso de levaduras del phylum Ascomycota se recomienda el análisis de una zona (D1D2) correspondiente a parte del gen que codifica para el ARN ribosomal 26S, y en ese caso, Kurtzman y Droby (2001), establecen que diferencias mayores al 1% en esta zona determinan que dos cepas pertenecen a especies diferentes. No existen datos similares para hongos filamentosos. En general para asegurar la identificación se analiza más de un gen y se espera que los resultados sean concordantes, o se utiliza una identificación polifásica.

El método se basa en la amplificación del gen o genes a secuenciar y continúa con la secuenciación de la región amplificada. La secuencia obtenida es comparada con secuencias de cepas de colección almacenadas en bancos de datos.

Se trata de un método sencillo, rápido y seguro, que en pocos pasos, asegura la identidad de un microorganismo.

PCR RFLP

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es un método de síntesis enzimático que se utiliza para amplificar fragmentos específicos de ADN *in vitro*.

RFLP es la sigla que corresponde a *Restriction Fragment Length Polymorphism*. Es una técnica que se basa en la variación de la ubicación de secuencias de nucleótidos que son reconocidos como sitios de acción por enzimas de restricción (Olive y Bean, 1999). Las enzimas de restricción reconocen estos sitios y digieren el ADN generando fragmentos de diferente tamaño según la ubicación de la secuencia blanco.

La combinación de ambos métodos, PCR-RFLP, se basa en la amplificación de una región de ADN y una posterior digestión con enzimas de restricción del amplicón. En general, las regiones elegidas para amplificar se caracterizan por tener una zona no codificante (menos conservada), la cual le da variabilidad al amplicón y por lo tanto pueden observarse diferencias luego de la digestión con enzimas de restricción.

Es un método que se utiliza para la identificación a nivel de especie, sustituyendo a la secuenciación. La limitante que presenta es que es necesario contar con cepas de colección, de identidad conocida, de forma de generar patrones de comparación con las cepas a identificar.

Algunas regiones génicas utilizadas para la identificación molecular de hongos

Región ITS1-5.8SrADN-ITS2

En hongos filamentosos, el ADN que codifica para el ARN ribosomal está organizado en unidades que se repiten cientos de veces a lo largo del genoma. Cada unidad está formada por tres genes, uno que codifica para la subunidad 18S, uno que codifica para la subunidad 5.8S y otro que codifica para la subunidad 26S. Estos genes están intercalados por secuencias no codificantes, denominadas ITS 1 e ITS 2 haciendo referencia a su sigla en inglés *Internal Transcribed Spacer*. A su vez, cada unidad está separada de la otra por una región denominada IGS haciendo referencia a su sigla en inglés *Inter Genic Spacer*, intercalada por el gen 5S. En la figura 3 se puede observar un esquema de esta zona.

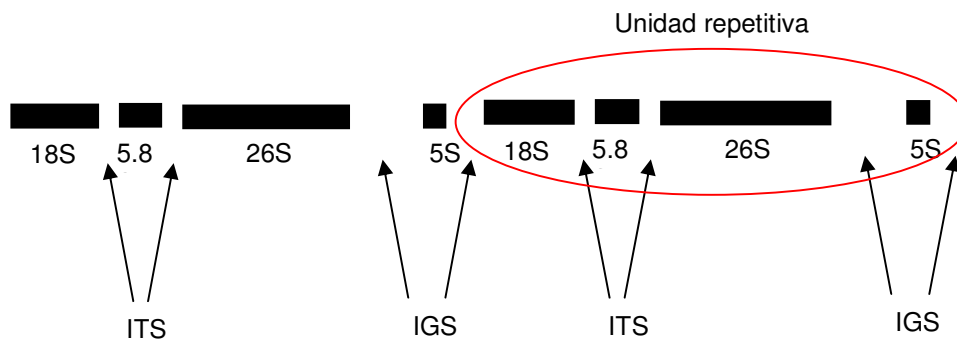


Figura 3. Diagrama de la región codificante para el ARN ribosomal. Adaptada de Mitchell y Zuccaro (2006)

La zona más comúnmente utilizada para la identificación a nivel de especie de hongos filamentosos es la denominada ITS1-5.8SrADN-ITS2, la cual se muestra en la Figura 4.

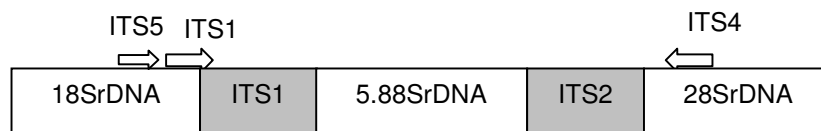


Figura 4. Diagrama de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2

La amplificación de esta zona se hace a partir de cebadores o *primers* universales diseñados a partir de las zonas altamente conservadas que codifican para el ARN ribosomal. Estos primers son ITS1 e ITS4 o ITS5, los cuales en la figura se representan con una flecha. La variabilidad a la región amplificada es aportada por las zonas no codificantes del ADN (ITS1 e ITS2), las cuales varían en secuencia y tamaño dependiendo del género y la especie. Dicha variabilidad se puede estudiar mediante secuenciación o RFLP con enzimas adecuadas.

β-tubulina

La β – tubulina es una proteína involucrada en la división celular celular y que además forma los microtúbulos del citoesqueleto. La región del ADN codificante para la proteína β – tubulina, es ampliamente utilizada para la identificación de hongos filamentosos. Al igual que la región ITS1–5.8SrADN-ITS2, se caracteriza por tener zonas no codificantes intercaladas entre los genes codificantes. Esta región presenta varias regiones que pueden se amplificadas con diferentes pares de primers. Por ejemplo, la figura 5, muestra la combinación de dos pares de primers, el par Bt1a y Bt1b y el par Bt2a y Bt2b. Este último par, es el que se utiliza para la identificación a nivel de especie de *Aspergillus*. Otras regiones de este gen se utilizan para la identificación a nivel de especie de otros géneros de hongos, como por ejemplo *Penicillium* y *Fusarium* (O'brien *et al.*, 2008; Mattila *et al.*, 2004).

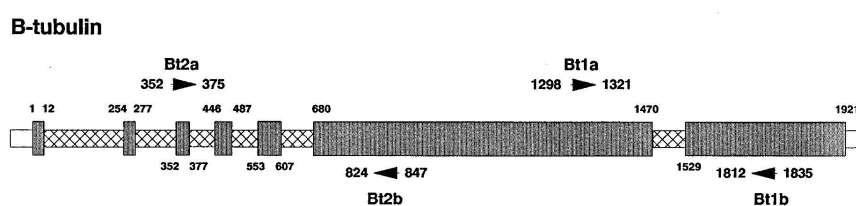


Figura 5. Diagrama de la región que codifica para la β – tubulina.
Fuente: Glass y Donladson, 1995

Calmodulina

La calmodulina es una proteína que participa en la entrada de calcio a la célula. Actúa como receptor para Ca^{+2} , gracias a que presenta cuatro sitios de unión al ion Ca^{+2} con una alta afinidad, pero siempre de forma reversible (Stevens, 1983). Su nombre es la abreviación de *CALcium MODULated proteIN* (Stevens, 1983).

En la figura 6 se muestra un diagrama del gen que codifica para dicha proteína en hongos. Al igual que en la región ITS, los primers utilizados para la amplificación de esta región se diseñan a partir de zonas conservadas de ADN. La variabilidad a la región amplificada es aportada por los espacios no codificantes. En la figura 6, se muestra un par de *primers*, CL1 y CL2A, con los cuales se podrá amplificar un región de aproximadamente 860 pb conteniendo zonas no codificantes de ADN.

B. Calmodulina

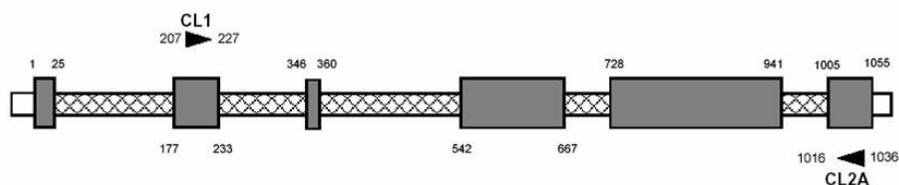


Figura 6. Diagrama de la región que codifica para la calmodulina.
Fuente. Serra y Peterson (2008)

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el nivel de riesgo de la presencia de ocratoxina A en vinos nacionales.

Objetivos específicos

1. Aislar cepas pertenecientes a la Sección *Nigri* posibles productoras de OTA de uvas.
2. Desarrollar un método de biología molecular, para identificar a nivel de especie, las cepas pertenecientes a la Sección *Nigri* aisladas de uva.
3. Poner a punto un método de extracción y purificación de ocratoxina A de uvas y vino.
4. Poner a punto de un método de detección y cuantificación de ocratoxina A por TLC y HPLC- FLD
5. Estudiar la capacidad de producir ocratoxina A, de las cepas pertenecientes a la Sección *Nigri* aisladas de uvas, en medio de cultivo y en uva de la variedad Tannat.
6. Determinar la sensibilidad *in vitro* de las cepas pertenecientes a la Sección *Nigri* aisladas de uvas, a fungicidas de uso convencional para el control de *Botrytis*.
7. Poner a punto el método de PCR en tiempo real para la cuantificación de *A. carbonarius* en uva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Puesta a punto de un método de biología molecular para diferenciar las especies pertenecientes a la Sección *Nigri* del género *Aspergillus*

Desarrollo de un método sencillo de biología molecular para la diferenciar las especies pertenecientes a la Sección *Nigri* del género *Aspergillus* descritas como contaminantes de uva

Se planteó el desarrollo de un método de biología molecular basado en PCR RFLP de distintas regiones genómicas para diferenciar las distintas especies de la Sección *Nigri* que podrían encontrarse en uvas uruguayas.

En primer lugar, se seleccionó la región genómica a analizar para la diferenciación de los distintos grupos. Es así que secuencias de parte de los genes que codifican la región ITS1-5.8SrADN-ITS2, calmodulina y β – tubulina de las cepas de colección *Aspergillus japonicus* cepa NRRL 1782, *Aspergillus aculeatus* cepa NRRL 5094^T, *Aspergillus uvarum* ITEM 5325, *A. niger* NRRL 1956, *A. foetidus* CBS 121.28; *A. tubingensis* NRRL 4875^T; *A. brasiliensis* NRRL 35542 y *A. carbonarius* NRRL 369^T, fueron tomadas del banco de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) y alineadas, de dos en dos, mediante el Nucleotide Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Se determinó el porcentaje de similitud entre las secuencias de dichos genes y se eligió la región génica más adecuada para cada etapa del método.

Desarrollo in silico de un método de biología molecular para la identificación de cepas pertenecientes a la Sección *Nigri* presentes en uva

*Desarrollo in silico de un método de biología molecular para la diferenciación de especies monoseriadas, de especies del Agregado *A. niger* y de *A. carbonarius**

Para diferenciar molecularmente las especies monoseriadas de la Sección, las especies pertenecientes al agregado *A. niger* y la especie *A. carbonarius* se desarrolló *in silico* un método basado en el RFLP de la región ITS1-5,8SrDNA-ITS2. Secuencias de las especies *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. uvarum*, *A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis* y *A. carbonarius* correspondientes a cepas de colección (*Aspergillus japonicus* cepa NRRL 1782, *Aspergillus aculeatus* cepa NRRL 5094^T, *Aspergillus uvarum* ITEM 5325, *A. niger* NRRL 1956, *A. foetidus* CBS 121.28; *A. tubingensis* NRRL 4875^T; *A. brasiliensis* NRRL 35542 y *A.*

carbonarius NRRL 369^T), depositadas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), fueron analizadas mediante el software Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) y Nebcutter 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Se seleccionó una enzima capaz de generar perfiles de restricción diferentes para las especies monoseriadas de la Sección *Nigri*, para el *A. carbonarius* y para las especies del agregado *A. niger*.

Desarrollo in silico de un método de biología molecular para la diferenciación de especies monoseriadas dentro la Sección *Nigri*

Para diferenciar entre las tres especies monoseriadas de la Sección, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus aculeatus* y *Aspergillus uvarum*, se realizó un RFLP del gen que codifica para la calmodulina. Las enzimas de restricción utilizadas, fueron seleccionadas mediante un RFLP *in silico* a partir de secuencias del gen que codifica para la calmodulina de cepas de colección almacenadas en GenBank (*Aspergillus japonicus* cepa NRRL 1782, *Aspergillus aculeatus* cepa NRRL 5094^T y *Aspergillus uvarum* ITEM 5325).

Las secuencias fueron analizadas con los software Webcutter 2.0 (<http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/>) y Nebcutter 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Se seleccionaron dos enzimas, que usadas en paralelo, eran capaces de generar perfiles de restricción diferentes para las mencionadas especies.

Desarrollo in silico de un método de biología molecular para la diferenciación de las especies pertenecientes al Agregado *A. niger*

La diferenciación a nivel de especie de las cepas pertenecientes al grupo N fue realizada mediante RFLP del gen que codifica para la calmodulina. La enzima de restricción utilizada fue seleccionada mediante un RFLP *in silico* de secuencias de *A. niger* (*A. niger* NRRL 1956) y *A. foetidus* (*A. foetidus* CBS 121.28) almacenadas en la base de datos GenBank y posteriormente analizadas mediante Webcutter 2.0 y Nebcutter 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), como se describió anteriormente.

La diferenciación a nivel de especie de las cepas pertenecientes al grupo T fue realizada mediante RFLP del gen que codifica para la calmodulina. La enzima de restricción utilizada fue seleccionada mediante un RFLP *in silico* de secuencias de *A. tubingensis* (*A. tubingensis* NRRL 4875^T) y *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* NRRL 35542) almacenadas en Gen Bank y posteriormente analizadas mediante Webcutter 2.0, como se describió anteriormente.

Validación del método de biología molecular, desarrollado in silico, para la identificación de cepas pertenecientes a la Sección Nigri presentes en uva.

Validación del método de biología molecular, desarrollado in silico, para la diferenciación entre especies monoseriadas, especies del Agregado A. niger y A. carbonarius

El método de RFLP de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2, desarrollado *in silico*, fue aplicado a cepas de colección, de forma de validarlo. Se utilizaron las cepas *Aspergillus japonicus* NRRL 1782, *Aspergillus aculeatus* NRRL 5094^T, *A. niger* NRRL 341^T, *A. tubingensis* NRRL 4875^T, *A. foetidus* NRRL 337, *A. brasiliensis* NRRL 26652^T y *A. carbonarius* NRRL 369^T pertenecientes a la colección ARS, USDA (Agricultural Research Service, United State Department of Agriculture). En el estudio se incluyó también la cepa de colección *A. carbonarius* CBS 111.26^T perteneciente a la colección CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures), Utrecht, Holanda.

Las cepas fueron cultivadas en 5 mL de medio YES (2% extracto de levadura, 15% sacarosa) a 25°C durante 5 días. Luego del tiempo de incubación, el micelio fue retirado con una pinza estéril y secado con papel estéril. Una porción del micelio de aproximadamente 150 mg se trasvasó a un tubo eppendorf estéril de 2 mL y se molió hasta polvo fino, en presencia de nitrógeno líquido utilizando una varilla de vidrio. A partir del micelio molido, se extrajo el ADN de acuerdo a Griffiths *et al.* (2000), con algunas modificaciones. Al micelio contenido en un eppendorf de 2 mL se le agregaron 300µL de agua MiliQ estéril, se homogeneizó y se agregó 700 µL de buffer CTAB (Anexo 1) y 10 µL de ARNasa de concentración 10mg/mL (Anexo 1). Se incubó a 65°C durante 30 minutos. Se retiró, se agregó 10 µL de Proteinasa K (Anexo 1) de concentración 10 mg/mL y se incubó nuevamente a 65°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 11.000 rpm durante 10 minutos y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo

eppendorf conteniendo 500 µL de cloroformo. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa se trasvasó a un nuevo tubo eppendorf y se agregaron dos volúmenes de la solución de precipitación CTAB (Anexo 1). Se incubó a temperatura ambiente durante una hora y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en NaCl 1.2M (Anexo 1). Se agregaron 350 µL de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa se trasvasó a un nuevo tubo eppendorf y se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol. Se incubó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 11.000 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se secó en estufa a 45°C y se resuspendió en 30 µL de agua MiliQ estéril. Se conservó a 4°C hasta su utilización.

La presencia o ausencia de ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) 0.8% con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0.5µg/mL. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook *et al.*, 1989)

La amplificación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 se realizó según Magnani *et al.* (2005). Los primers utilizados fueron ITS1 (5´ - TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3´) e ITS4 (5´- TCCTCCGCTTATTGATA TGC – 3´), ambos sintetizados por BYO.SYNTHESIS Company (Lewisville, TX). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 2,5 µL Buffer 10X (Fermentas International Inc., Canadá), 16.9 µL de agua miliQ estéril, 1 µL de cada primer 25 µM, 2.5 µL de dNTP 2 µM, 0.1 µL de Taq polimerasa (Fermentas International Inc., Canada) 5U/ µL y 1 µL de ADN de concentración aproximada 100ng/µL. La amplificación comenzó con un paso de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 95°C 1 minuto, 55°C 1 min, 72°C 2 min y una extensión final de 72°C 10 minutos. La amplificación se realizó en un termociclador MultiGene Mini Labnet International, Inc. (Edison, NJ, USA).

El producto de PCR fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) 0.8% con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0.5µg/mL. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook *et al.*, 1989). El tamaño del amplicón fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 50bp DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá) (Anexo 2).

Los amplicones fueron tratados con la enzima de restricción seleccionada en el desarrollo *in silico*, de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

Los fragmentos de restricción fueron determinados mediante electroforesis en gel de agarosa (Laboratorios Conda, Madrid, España) 1.5% con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0.5 µg/mL. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook *et al.*, 1989). Los tamaños de los productos de restricción obtenidos fueron estimados por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 50bp DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá).

Validación del método de biología molecular, desarrollado in silico, para la diferenciación entre especies monoseriadas de la Sección Nigri

El método de RFLP de la región que codifica para la calmodulina, desarrollado *in silico*, fue aplicado a cepas de colección, de forma de validarlo. Se utilizaron las cepas *A. japonicus* NRRL 1782 y *A. aculeatus* NRRL 5094^T.

La amplificación del gen que codifica para la calmodulina fue realizado de acuerdo a Serra y Peterson (2008). Los primers utilizados fueron CF1 (5'- GCCGACTCTTTGACYGARGAR 3') y CF4 (5'- TTTYTGATCATRAGYTGGAC- 3'), ambos sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, USA). La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 2.5 µL Buffer 10X (Fermentas International Inc., Canada), 16.9 µL de agua miliQ estéril, 1 µL de cada primer 25 µM, 2.5 µL de dNTP 2 µM, 0.1 µL de Taq polimerasa (Fermentas International Inc., Canada) 5u/ µL y 1 µL de ADN de concentración aproximada 100 ng/µL. La amplificación consistió en un paso de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 96°C 30 segundos, 51°C 1 minuto, 72°C 1 minuto y una extensión final de 5 minutos a 72°C. La amplificación se realizó en un termociclador MultiGene Mini Labnet International, Inc. (Edison, NJ, USA).

El producto de PCR fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) 0.8% con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0.5µg/mL. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook *et al.*, 1989). El tamaño

del amplicón fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™100bp DNA ladder, Fermentas International Inc., Canadá) (Anexo 2).

Los amplicones fueron tratados con las enzimas de restricción seleccionadas en el desarrollo *in silico*, de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

Los fragmentos de restricción fueron determinados mediante electroforesis en gel de agarosa (Laboratorios Conda, Madrid, España) 1.5% con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0.5µg/mL. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook *et al.*, 1989). Los tamaños de los productos de restricción obtenidos fueron estimados por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 50bp DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá) (Anexo 2).

Validación del método de biología molecular, desarrollado *in silico*, para la diferenciación de las especies del Agregado *A. niger*.

El método de RFLP de la región que codifica para la calmodulina desarrollado *in silico* fue aplicado a cepas de colección, de forma de validarlo. Se utilizaron las cepas *A. niger* NRRL 341^T y *A. foetidus* NRRL 337, pertenecientes al grupo N y *A. tubingensis* NRRL 4875^T y *A. brasiliensis* NRRL 26652^T, pertenecientes al grupo T.

La amplificación del gen que codifica para la calmodulina fue realizada según Serra y Peterson (2008), como se mencionó anteriormente. Los amplicones fueron tratados con la enzima de restricción seleccionada en el desarrollo *in silico*, de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

Los fragmentos de restricción fueron determinados mediante electroforesis en gel de agarosa (Laboratorios Conda, Madrid, España) 1.5% con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0.5 µg/mL. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook *et al.*, 1989). Los tamaños de los productos de restricción obtenidos fueron estimados por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™1Kb DNA ladder, Fermentas International Inc., Canadá; GeneRuler™ 50bp DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá) (Anexo 2).

Métodos de extracción, purificación, detección y cuantificación de OTA

Preparación de la solución Stock de Ocratoxina A

Como estándar se utilizó Ocratoxina A adquirida en Sigma. El contenido de un tubo de ocratoxina A fue disuelto en 500 µL de metanol (Mallinckrodt Chemicals) calidad HPLC, alcanzando una concentración aproximada de 200µg/mL. La concentración exacta de la solución estándar fue determinada por espectrofotometría, midiendo la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de 333nm, donde la absortividad molar es $\epsilon = 6640 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, de acuerdo a Pelegri *et al.* (1987). Esta solución fue almacenada a 4°C hasta su utilización.

Método de detección cualitativa de OTA

Puesta a punto de TLC

Se realizó TLC según AOAC (1990). Como solvente de corrida se utilizó la mezcla tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (5:4:1). La detección se realizó visualmente bajo lámpara UV ($\lambda = 366 \text{ nm}$). Se confirmó la presencia de OTA exponiendo la placa de sílica gel a vapores de amoníaco previo a una nueva exposición bajo lámpara UV.

Para determinar el límite de detección del método, se sembró solución estándar de OTA de forma de alcanzar las siguientes cantidades: 125ng, 62.5ng, 25ng, 12.5ng, 6.25ng, 3.125ng, 2.5ng, 1.25ng, 0.625ng, 0.5ng, 0.25ng, 0.125ng. El límite de detección del método fue aquella cantidad de OTA a partir de la cual no hubo detección.

Método de cuantificación de OTA

Puesta a punto del método HPLC- FLD para la cuantificación de OTA

El equipo de HPLC consistió en un bomba Waters 510 (Waters, Millipore Corporation), un válvula de inyección y una columna C18 Novapak 60A 4µM de dimensiones 3.9x 300 mm (Waters, Millipore Corporation) con una conexión previa a una precolumna Guard-Pak Novapak C18 (Waters, Millipore Corporation). La salida de la columna se conectó a un detector de fluorescencia Shimadzu RF10AXL. La respuesta generada por el detector fue analizada mediante el software Peak 3.72.

De acuerdo a Visconti *et al.* (1999), la longitud de onda de emisión utilizada fue 333nm, la longitud de onda de excitación fue 460nm y la fase móvil consistió en acetonitrilo : agua :ácido acético en las proporciones 99:99:2, respectivamente. El flujo de fase móvil fue optimizado en 0.9mL/minuto.

Se construyó la curva de calibración, abarcando el rango de concentraciones comprendido entre 0.28 ppb y 281 ppb. Cada concentración se analizó por triplicado. Para cada punto se determinó el valor promedio y el intervalo de confianza con $\alpha = 0,05$. Se determinó el límite de detección como la concentración a partir de la cual la señal de respuesta era aproximadamente el doble de la señal de ruido.

Métodos de extracción de OTA de jugo de uva y vino de la variedad Tannat

Determinación del porcentaje de recuperación de la extracción líquido-líquido

A diez mililitros de jugo de uva, hecho de forma manual, a partir de uva de la variedad Tannat, se adicionó solución estándar de OTA, preparada como se mencionó anteriormente, hasta alcanzar una concentración final de 2 ppb y 10 ppb. Cada tratamiento se ensayó por duplicado. La extracción de la toxina se hizo de acuerdo a Saez *et al.* (2004) con algunas modificaciones. El jugo de uva fue acidificado con ácido fosfórico hasta pH 2.0-2.2 y la extracción de la toxina se hizo mediante una extracción líquido - líquido, en medio ácido y con cloroformo como solvente de extracción. La extracción se hizo en tres etapas, utilizando en cada etapa 5mL de cloroformo (Dorwil). Los extractos se unificaron y el solvente se evaporó hasta sequedad. El extracto obtenido fue resuspendido en 300 μ L de metanol (Mallinckrodt Chemicals) calidad HPLC.

La cuantificación de la ocratoxina A presente en el extracto se realizó por HPLC con detector de fluorescencia de acuerdo a Visconti *et al.* (1999). Para cada concentración se calculó la concentración esperada en el extracto. A partir de este valor y la concentración determinada, se calculó el porcentaje de recuperación del método. De acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración determinada}}{\text{Concentración esperada}} \times 100$$

El porcentaje de recuperación se determinó también para vino contaminado. Para ello, se repitió el procedimiento anterior, partiendo de 10mL de vino de la variedad Tannat.

Método de purificación alternativo

Determinación del porcentaje de recuperación de las columnas C18.

La determinación del porcentaje de recuperación de las columnas C18 500mg (J.T. Baker) fue realizado de acuerdo al mejor resultado obtenido por Tessini *et al.* (2010). Muestras de cinco mililitros de vino de la variedad Tannat fueron contaminadas con OTA (Sigma) hasta alcanzar concentraciones de 0,2; 0,5; 1; 2 y 3 ppb. Se incluyó una muestra sin contaminar. Cada muestra fue diluida con 5mL de agua destilada y reservada a 4°C hasta su utilización. Las columnas de C18 fueron activadas con 5mL de metanol seguidos de 5mL de agua destilada. Luego de la activación, las muestras fueron preconcentradas en las columnas, las cuales fueron posteriormente lavadas con 2mL de metanol seguido de 2mL de una mezcla de metanol:agua (60:40). Por último la OTA fue eluida con 2mL una mezcla de metanol: ácido acético (99.5:0.5). Los extractos obtenidos fueron almacenados a -20°C.

La cuantificación de la ocratoxina A presente en cada extracto se realizó por HPLC con detector de fluorescencia de acuerdo a Visconti *et al.* (1999). Para cada concentración se calculó la concentración esperada en el extracto. A partir de este valor y la concentración determinada, se calculó el porcentaje de recuperación del método. De acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración determinada}}{\text{Concentración esperada}} \times 100$$

El porcentaje de recuperación se determinó también para jugo de uva contaminado. Para ello, se repitió el procedimiento partiendo de 5mL de jugo de uva de la variedad Tannat.

Aislamiento e identificación de cepas
posibles productoras de ocratoxina A

Muestreo de uvas y aislamiento de cepas posibles productoras de OTA

Durante las cosechas 2006, 2007 y 2008 se realizaron muestreos de uvas utilizadas para la producción de vino en un viñedo comercial de Canelones. Las variedades tintas incluidas fueron: Tannat, Merlot y Cabernet Sauvignon, mientras que las variedades blancas fueron: Chardonnay y Sauvignon Blanc. En la cosecha 2009 el muestreo se extendió a viñedos comerciales de Colonia, San José, Florida, Atlántida, Canelones Sauce y Maldonado. En este caso se muestrearon solamente uvas de la variedad Tannat.

En cada caso, se seleccionó un cuadro del cual se muestrearon 10 racimos pertenecientes a plantas ubicadas a lo largo de una diagonal. Los racimos fueron colocados en bolsas individuales y llevados al laboratorio. Cinco uvas de cada racimo fueron colocadas de forma aséptica en placas de Petri conteniendo Papa Dextrosa Agar (PDA, Difco) adicionado en Neomicina hasta una concentración de 50 ppm. Las placas se incubaron a 25°C durante 5 días.

Luego del tiempo de incubación se determinó la flora microbiana presente. Las colonias que presentaron características macro y microscópicas típicas de *Aspergillus* pertenecientes a la Sección *Nigri* fueron reaisladas en PDA (Serra *et al.*, 2003).

A partir de los reaislamientos, se realizaron cultivos monospóricos de modo de obtener cultivos puros. Las cepas fueron almacenadas en tubos de PDA inclinado a 4°C hasta su identificación.

Paralelamente, se realizó un recuento en superficie de la flora microbiana presente en la uva muestreada durante la cosecha 2009. Para ello, 10 g de uva fueron adicionados a 90 mL de suero fisiológico estéril y homogeneizados en un stomacher (Stomacher 400, Seward). Esta suspensión fue considerada la dilución 1/10. A partir de esta suspensión se realizaron dos diluciones seriadas. Cien microlitros de las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 fueron sembrados en superficie en placas conteniendo Dicloran Rosa de Bengala Agar (DRBA, Sigma) e incubadas a 25°C durante 5 días. En caso de obtener colonias con características macroscópicas de *Aspergillus* pertenecientes a la Sección *Nigri*, las mismas fueron reaisladas y sometidas al tratamiento mencionado anteriormente.

Identificación fenotípica a nivel de especie de cepas de *Aspergillus* pertenecientes a la Sección *Nigri* aisladas

Las colonias con características macro y microscópicas típicas de *Aspergillus* pertenecientes a la Sección *Nigri* fueron identificadas fenotípicamente a nivel de especie según Pitt y Hocking (1997), Samson *et al.* (2004) y Samson *et al.* (2007).

En una primera instancia, las cepas fueron observadas microscópicamente de forma de ser clasificadas en monoseriadas o biseriadas. Posteriormente, siguiendo las claves mencionadas, se inocularon puntualmente en diferentes medios de cultivo y se incubaron a diferentes temperaturas, de acuerdo a las claves desarrolladas por Samson *et al.* (2004) y Samson *et al.* (2007). En cada caso se midió el diámetro de la colonia alcanzado y se observaron las características macroscópicas de cada colonia.

Identificación de las cepas aisladas mediante el método de biología molecular desarrollado

Diferenciación de especies monoseriadas, Agregado *A. niger* y *A. carbonarius*

Las cepas aisladas de uva y clasificadas fenotípicamente como monoseriadas o biseriadas fueron diferenciadas en monoseriadas, pertenecientes al agregado *A. niger* o a la especie *A. carbonarius* utilizando el método de biología molecular desarrollado anteriormente.

La extracción de ADN de todas las cepas aisladas, se realizó de acuerdo a Griffiths *et al.* (2000). La amplificación de la región ITS1- 5.8SrADN-ITS2 fue realizada según Magnani *et al.* (2005). El RFLP de la región fue realizado como se mencionó anteriormente.

Identificación de las cepas monoseriadas aisladas de uva

Las cepas monoseriadas, aisladas de uva fueron diferenciadas a nivel de especie a través del método de biología molecular desarrollado, descrito anteriormente.

La amplificación de la región que codifica para la calmodulina fue realizada según Serra y Peterson (2008). El RFLP de la región fue realizado como se mencionó anteriormente.

Caracterización molecular de cepas pertenecientes al agregado A. niger aisladas de uva

Las cepas identificadas como pertenecientes al agregado *A. niger*, fueron clasificadas en pertenecientes al grupo N o T de acuerdo al perfil obtenido a partir del RFLP de la región ITS1-5,8SrDNA-ITS2, según Bau *et al.* (2006).

La amplificación de la región ITS1-5,8SrDNA-ITS2 se realizó de acuerdo a Magnani *et al.* (2005). El producto de amplificación fue digerido con la enzima de restricción *RsaI* (Fermentas International Inc., Canadá), de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

Los fragmentos de restricción fueron determinados mediante electroforesis en gel de agarosa (Laboratorios Conda, Madrid, España) 1.5% con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0.5 µg/mL. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook *et al.*, 1989). Los tamaños de los productos de restricción obtenidos fueron estimados por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb DNA ladder, Fermentas International Inc., Canadá) (Anexo 2).

Diferenciación a nivel de especie de las cepas pertenecientes al agregado A. niger

Las cepas aisladas de uva, pertenecientes al agregado *A. niger*, previamente clasificadas en pertenecientes al grupo N o T, fueron identificadas a nivel de especie utilizando el método de biología molecular desarrollado.

La amplificación de la región que codifica para la calmodulina fue realizada según Serra y Peterson (2008). El RFLP de la región fue realizado como se mencionó anteriormente.

Confirmación de la identidad por secuenciación

Veinticinco de las cepas aisladas e identificadas a través del método de biología molecular desarrollado, fueron analizadas mediante secuenciación de la región que codifica para la calmodulina, de forma de confirmar los resultados obtenidos. Este gen fue elegido debido a que presenta la variabilidad suficiente como para diferenciar todas las especies involucradas.

La amplificación del gen que codifica para la calmodulina fue realizado según Serra y Peterson (2008), como se mencionó anteriormente.

Los amplicones fueron secuenciados de forma unidireccional en el laboratorio MacroGen Inc. (Seul, Corea). Las secuencias parciales obtenidas fueron comparadas con la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) mediante el Nucleotide Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

A partir de las secuencias obtenidas se construyó un árbol de similitud utilizando el software Mega 4 (<http://www.megasoftware.net/>). Para la construcción del árbol se utilizaron secuencias de dicho gen de las especies en estudio almacenadas en la base de datos Gen Bank (*Aspergillus japonicus* NRRL 1782, *Aspergillus aculeatus* NRRL 5094^T y *Aspergillus uvarum* ITEM 5325, *A. niger* NRRL 1956^T; *A. foetidus* CBS 121.28; *A. tubingensis* NRRL 4875^T; *A. brasiliensis* NRRL 35542^T y *A. carbonarius* NRRL 369^T). Las secuencias se alinearon utilizando Clustal W v.1.6 (Higgins *et al.*, 1994) como parte del programa MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007). Los árboles filogenéticos se construyeron por Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) y las distancias evolutivas fueron computadas con el método de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969). Todas las posiciones conteniendo datos faltantes fueron eliminadas previo al análisis (*complete deletion option*). La estabilidad de los grupos fue alcanzada con 1000 repeticiones (*bootstrap*).

Caracterización de las cepas
pertenecientes a la Sección *Nigri* aisladas

Estudio de la capacidad de producir OTA en medio de cultivo

Para todas las cepas, se estudió de la capacidad de producir ocratoxina A en el medio de cultivo Czapeck Yeast Agar (CYA) (Anexo 3), de acuerdo a Esteban *et al.* (2006a). En paralelo se determinó la capacidad de producir OTA en el medio de cultivo CYA para la cepa *A. carbonarius* NRRL 369^T perteneciente a las colección ARS, USDA (Agricultural Research Service, United State Department of Agriculture). Además, para trece cepas pertenecientes al agregado *A. niger*, se estudió la capacidad de producir OTA en el medio de cultivo YES agar (Anexo 3) por ser el método más adecuado para estas especies según bibliografía (Esteban *et al.*, 2006a; Esteban *et al.*, 2006b).

Diez microlitros de una suspensión de conidias de concentración 1×10^6 conidias/mL fue inoculada de forma puntual en el centro de la placa conteniendo CYA e incubada durante 10 días a 15-16°C (Esteban *et al.*, 2006a). Para trece cepas identificadas como pertenecientes al agregado de *A. niger*, la capacidad productora se estudió también en YES agar, inoculando de la forma mencionada anteriormente e incubada durante 6 días a 15-16°C según Esteban *et al.*, 2006b. En todos los casos, de acuerdo a Bragulat *et al.* (2001), luego del tiempo de incubación, tres trozos circulares de 0.5mm de diámetro de dicho medio se colocaron en un vial y se agregaron 500µL de metanol calidad HPLC (Mallinckrodt Chemicals). Se dejaron a temperatura ambiente durante 60 minutos, se homogeneizaron y luego se recuperó el sobrenadante mediante filtración a través de papel de filtro de acetato de celulosa 0.45µm (Sartorius Stedimu Biotech, Goettingen, Germany). El extracto obtenido fue conservado a -20°C hasta su utilización. Cada cepa fue analizada por duplicado.

Los extractos obtenidos fueron analizados mediante HPLC con detector de fluorescencia de acuerdo a Visconti *et al.* (1999). Las muestras positivas fueron confirmadas por HPLC-MS en el laboratorio de Análisis Químico, Polo tecnológico de Pando por la Dra. Alejandra Rodríguez.

Los análisis de HPLC-MS se realizaron en un equipo de HPLC Agilent 1200 equipado con un detector de arreglo de diodos, bomba binaria y columna termostatizada a 40°C, acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire 6000 (Bruker Daltonik GmbH). Las

muestras se analizaron utilizando una columna analítica de fase reversa Zorbax EclipseXDB-C18 (Agilent Technologies) de 150mm largo, 4.6mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil consistió en ácido fórmico 10mM (A) y acetonitrilo (B). Se inyectaron 10 µL de las muestras disueltas en metanol calidad HPLC (Mallinckrodt Chemicals). El método cromatográfico consistió en un gradiente lineal desde 40 a 65% de (B) en 15 min, subiendo 80% de (B) en 0.1 min, seguido de una etapa isocrática de 80% de (B) por 5 min, y re-equilibración a 40% de (B), con un tiempo total de corrida de 25 min y un flujo de 0.8mL/min. El análisis en tandem de espectrometría de masa se realizó en trampa de iones con ionización por electrospray, operado en modo de ión-positivo, con ion precursor m/z 404. Las condiciones del electrospray fueron las siguientes: endplate off set voltage -500V, capillary voltage -4000V, nebulización con nitrógeno a 40 psi, secado con nitrógeno a un flujo de 9.0 L/min y una temperatura de 350°C.

Estudio de la capacidad de producir OTA en uva Tannat

Se determinó la capacidad de producir OTA en uva de la variedad Tannat de acuerdo a Díaz *et al.* (2009) para cinco cepas pertenecientes a la colección de cepas aisladas de uvas. Las cepas utilizadas fueron: la cepa 06Mt1, identificada como *A. uvarum*; la cepa 06AV3, identificada como *A. foetidus*; las cepas 09Ca8 y 09Ca2, identificadas como *A. niger* y la cepa 06AVS20 identificada como *A. tubingensis*-like. Estas cepas fueron elegidas debido a que presentaron capacidad media de producción de OTA en medio de cultivo. En forma paralela, se estudió la capacidad de producir OTA en uvas de la variedad Tannat de la cepa comercial *A. carbonarius* NRRL 369.

Para cada cepa, 50 uvas Tannat se desinfectaron superficialmente con etanol 70%, se enjuagaron con agua destilada estéril, se secaron a temperatura ambiente y se pesaron. Las uvas se inocularon puntualmente en heridas realizadas con una aguja estéril con 5µL de una suspensión de conidias de concentración 1×10^6 conidias /mL, ajustada por conteo en cámara de Neubauer. Las uvas se incubaron a 20°C durante 7 días. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se obtuvo jugo de uvas de forma manual y se separó el jugo del hollejo mediante filtración. El jugo se acidificó con ácido fosfórico hasta pH 2.0 – 2.2 y la extracción de la toxina se hizo mediante una extracción líquido - líquido, con cloroformo de acuerdo a

Saez *et al.* (2004). La extracción se realizó en tres pasos, como se mencionó anteriormente. Los tres extractos se unificaron y el solvente se evaporó hasta sequedad. El extracto obtenido fue resuspendido en 300µL de metanol calidad HPLC.

La cuantificación de la ocratoxina A producida se analizó por HPLC con detector de fluorescencia de acuerdo a Visconti *et al.* (1999). Las muestras positivas fueron confirmadas por HPLC MS en el laboratorio de Análisis Químico, Polo Tecnológico de Pando por la Dra. Alejandra Rodríguez, como se describió anteriormente.

Determinación *in vitro* de la sensibilidad a fungicidas de uso convencional

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de pirimetanil, procymidone e iprodione para las cepas de *Aspergillus* pertenecientes a la Sección *Nigri* aisladas. Se utilizó el método de dilución en agar desarrollado por Cabañas *et al.* (2009) con algunas modificaciones. En el caso de procymidone e iprodione la CIM se determinó en placas de PDA adicionadas en diferentes concentraciones de cada fungicida. En el caso de Pirimetanil, la CIM se determinó en placas de gelatina- glucosa agar (GG) de acuerdo a Sierotzki y Edel (2006).

Se sembró en forma puntual, en cada una de ellas, 1µL de una suspensión de conidias de concentración 1×10^5 conidias/mL. Se sembraron 9 cepas por placa y como control se inocularon de igual forma, placas de PDA y GG sin fungicida.

Las placas inoculadas se incubaron a 25°C durante 3 días en oscuridad. Se determinó la concentración mínima inhibitoria de fungicida como aquella a la cual hubo 100% de inhibición de crecimiento.

Las formulaciones comerciales de estos fungicidas utilizadas en este ensayo fueron las siguientes: iprodione, Abril 50SC (Proquimur, Uruguay); procymidone, Produe 50SC (Proquimur, Uruguay) y pirimetanil, Venthos SC (Proquimur, Uruguay). Las concentraciones ensayadas fueron 2; 4; 8; 16; 32 y 64 ppm en el caso de Iprodione y Pirimetanil. En el caso de Procymidone, las concentraciones ensayadas fueron 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 y 1024

ppm. La cantidad de formulación comercial adicionada fue calculada de forma de alcanzar la concentración de ingredientes activos mencionada.

Cuantificación de *Aspergillus carbonarius* por PCR en tiempo real

Cepas utilizadas

La cepa de *A. carbonarius* utilizada en la puesta a punto del método de PCR en tiempo real fue la cepa de colección CBS 111.26, perteneciente a la colección Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda. Las restantes cepas de la Sección *Nigri* utilizadas pertenecieron a las especies *A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis* - like y *A. uvarum*, las cuales fueron aisladas de uvas uruguayas y previamente identificadas genotípicamente mediante secuenciación de la región que codifica para la camodulina.

Extracción de ADN

Las cepas fueron cultivadas en 10mL de YES (2% extracto de levadura, 15% sacarosa) a 25°C durante 5 días. Luego del tiempo de incubación una porción del micelio se trasvasó a un tubo eppendorf estéril de 2mL y se molió hasta polvo fino, en presencia de nitrógeno líquido utilizando una varilla de vidrio. Se extrajo el ADN total mediante la propuesta por Griffiths *et al.* (2000).

La presencia o ausencia de ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% con bromuro de etidio como indicador. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook *et al.*, 1989)

Puesta a punto de PCR en tiempo real para la cuantificación de *A. carbonarius*

El método de PCR en tiempo real se realizó de acuerdo a González Salgado (2010) y González Salgado *et al.* (2009). Los primers utilizados fueron QCarbo1 (5'-GGGCTTTGTCACATGCTCTGTA - 3') y QCarbo2 (5' – CTGGAAAAAAGGTTGGAGTTGTC – 3'), sintetizados por SBS Genetech Co., Ltd (Beijing, China), que amplifican un fragmento de 66 pb. La reacción de PCR en tiempo real transcurrió en un volumen de reacción de 10 µL conteniendo 5 µL de mix Rotor gene SyBr Green PCR kit (Qiagen), 1 µL de cada primer de concentración 5 µM, 0.5 µL de agua miliQ estéril y 2.5 µL de ADN de concentración aproximada de 100ng/µL. El ciclo de amplificación consistió en un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. La reacción se llevó a cabo en un equipo RotorGene 6000, Corbett Life Science.

Especificidad de los primers por PCR convencional

Los primers Qcarbo1 y Qcarbo2 fueron enfrentados a las cinco especies de la Sección *Nigri* (*A. carbonarius*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. tubingensis*-like y *A. uvarum*) en una reacción de PCR de volumen final 25 µL de acuerdo a las siguientes condiciones: 2,5 µL Buffer 10X (Fermentas International INC., Canada), 16,9 µL de agua miliQ estéril, 1 µL de cada primer 5 µM, 2,5 µL de dNTP 2 µM, 0,1 µL de Taq polimerasa (Fermentas International INC., Canada) 5u/ µL y 1 µL de ADN. El ciclo de amplificación consistió en 35 ciclos de 95°C 1 minuto, 60°C 1 min, 72°C 2 min. La amplificación se realizó en una termociclador MultiGene Mini Labnet International, INC. (Edison, NJ, USA). El producto de PCR fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) 0,8% con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0,5 µg/mL. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook *et al.*, 1989).

Curvas estándar

El ADN genómico de *A. carbonarius* fue cuantificado utilizando el fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Se realizaron diluciones seriadas en base diez de la solución del ADN genómico en agua. Para cada concentración de ADN, se llevó a cabo la PCR en tiempo real. Paralelamente, se realizó un blanco, conteniendo agua miliQ estéril. Cada concentración de ADN y el blanco se ensayaron por triplicado. Para cada caso, se determinó el *Cycle threshold* (Ct). Para cada punto, se calculó el promedio y el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$). A partir de los valores de Ct correspondientes a cada concentración, se realizó una curva de calibración, graficando Ct en función del logaritmo de la concentración de ADN. Se determinó la linealidad, el rango dinámico, como el rango de concentraciones dentro del cual la curva es lineal y la eficiencia con la siguiente fórmula, según Rebrikov y Tromfimov (2006).

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

Especificidad de los primers en PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real descrita anteriormente, se realizó también para las restantes especies de la Sección *Nigri* aisladas de uvas uruguayas (*A. niger*, *A. uvarum*, *A. foetidus* y *A.*

tubingensis – like). Para todos los casos, se cuantificó ADN genómico con el fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen) y se realizaron las diluciones correspondientes de forma de abarcar las mismas concentraciones de ADN ensayadas para la cepa de *A. carbonarius*. Se incluyó un blanco y una concentración de *A. carbonarius* como control positivo. Cada concentración de *A. niger*, *A. uvarum*, *A. foetidus*, *A. tubingensis - like*, *A. carbonarius* y el blanco se ensayó por triplicado. Se determinó el Ct correspondiente a cada concentración. Para cada punto se calculó el valor promedio y el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$).

Influencia de la matriz en la PCR en tiempo real.

Para el estudio de influencia de la matriz en el análisis se ensayó la técnica de extracción de ADN para una muestra de 3g de uva Tannat. Al extracto obtenido fueron agregadas diferentes cantidades de ADN genómico de *A. carbonarius* de forma de obtener las concentraciones correspondientes de ADN ensayadas en la curva estándar y cada concentración se sometió a PCR en tiempo real. En paralelo, se incluyó un blanco y diluciones realizadas con agua, de forma de comparar los Ct obtenidos en cada caso y de esta forma determinar inhibición por la matriz. Cada concentración, tanto en presencia de la matriz de estudio, como en presencia de agua, y el blanco, se ensayaron por triplicado. Para cada punto se calculó el valor promedio y el intervalo de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Puesta a punto de un método de biología molecular para diferenciar las especies pertenecientes a la Sección *Nigri* del género *Aspergillus*

Desarrollo de un método sencillo de biología molecular para la diferenciar las especies pertenecientes a la Sección *Nigri* del género *Aspergillus* descritas como contaminantes de uva

A partir del alineamiento de las secuencias de los genes que codifican la región ITS1-5.8SrADN-ITS2, calmodulina y β -tubulina de las cepas de colección *Aspergillus japonicus* cepa NRRL 1782, *Aspergillus aculeatus* cepa NRRL 5094^T, *Aspergillus uvarum* ITEM 5325, *A. niger* NRRL 1956, *A. foetidus* CBS 121.28; *A. tubingensis* NRRL 4875^T; *A. carbonarius* NRRL 369^T, se determinó que el gen que codifica la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 es el más adecuado para la diferenciación entre las especies monoseriadas, las especies del agregado *A. niger* y la especie *A. carbonarius*. En este caso, el porcentaje de similitud entre las especies de cada grupo es cercana al 100%. En la tabla 1, se muestra el porcentaje de similitud entre cada grupo.

Similitud entre		% similitud
<i>A. carbonarius</i>	Especies monoseriadas	86
<i>A. carbonarius</i>	Agregado <i>A. niger</i>	96
Agregado <i>A. niger</i>	Especies monoseriadas	87

Tabla 1. Porcentaje de similitud de secuencias de la región ITS1- 5.8SrADN-ITS2 de las especies monoseriadas, especies del agregado *A. niger* y *A. carbonarius*

Se determinó que el gen más adecuado para la diferenciación dentro las especies del agregado *A. niger* y entre las especies monoseriadas, es el que codifica para la calmodulina. Si bien porcentajes de similitud de las secuencias del gen que codifica para la β -tubulina, fueron muy parecidos a los expuestos para el caso de la calmodulina, se determinó que la amplificación de dicho gen fue más dificultosa que la amplificación de la calmodulina. Es por este motivo que el gen que codifica para la β -tubulina fue descartado.

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados del alineamiento de secuencias del gen que codifica para la calmodulina.

Similitud entre		% similitud
<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	91
<i>A. niger</i>	<i>A. foetidus</i>	91
<i>A. niger</i>	<i>A. brasiliensis</i>	89
<i>A. tubingensis</i>	<i>A. foetidus</i>	91
<i>A. tubingensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	89
<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. foetidus</i>	90

Tabla 2. Porcentaje de similitud de secuencias de la región que codifica para la calmodulina de las especies del agregado *A. niger*

Similitud entre		% similitud
<i>A. japonicus</i>	<i>A. aculeatus</i>	93
<i>A. japonicus</i>	<i>A. uvarum</i>	95
<i>A. aculeatus</i>	<i>A. uvarum</i>	95

Tabla 3. Porcentaje de similitud de secuencias de la región que codifica para la calmodulina de las especies monoseriadas

Desarrollo in silico de un método de biología molecular para la identificación de cepas pertenecientes a la Sección Nigri presentes en uva

Desarrollo in silico de un método de biología molecular para la diferenciación de especies monoseriadas, especies del Agregado A. niger y la especie A. carbonarius

A través de un RFLP *in silico* de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2, utilizando secuencias de cepas de colección, se determinó que la enzima adecuada para lograr la diferenciación entre las especies monoseriadas, las pertenecientes al agregado *A. niger* y la especie *A. carbonarius* era la enzima de restricción *BsaHI*.

En la figura 1, se muestran los patrones de bandas que se obtendrían en una electroforesis en gel de agarosa 0,8%, para las especies que presentan corte con la enzima de restricción. El esquema presentado se obtiene mediante el software Nebcutter 2.0. Los

tamaños de bandas obtenidas se pueden deducir utilizando la escala de tamaños mostrada a la izquierda de cada esquema.

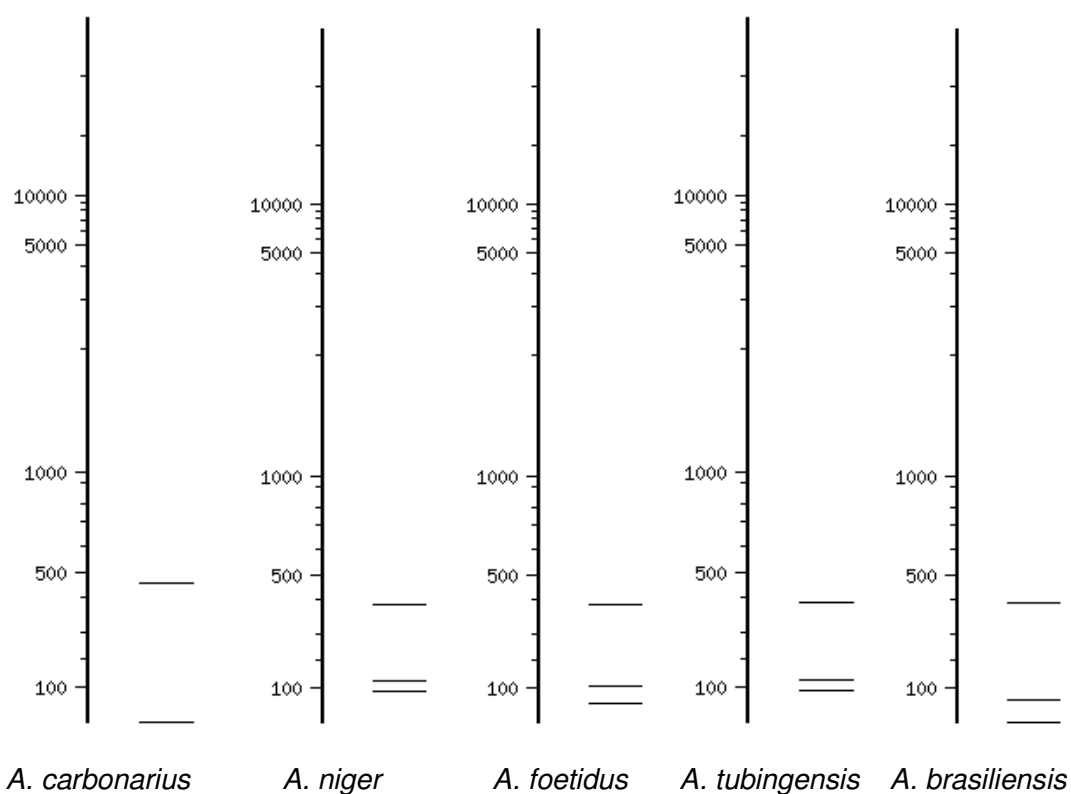


Figura 1. Patrón de bandas obtenido para RFLP de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 con *Bsa*HI para *A. carbonarius* y especies del agregado *A.niger*.

En el caso del grupo *A. japonicus*/ *A. aculeatus*/ *A. uvarum*, se espera un fragmento sin digerir de 600 pb, mientras que para las especies del agregado *A. niger* (*A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis* y *A. brasiliensis*) se observan dos fragmentos de restricción de 385 pb y 120 pb respectivamente. En el caso de *A. carbonarius*, se observa un fragmento de restricción de 500 pb. En todos los casos se obtendría un fragmento menor, que quizás no sea observable en un gel real.

Desarrollo in silico de un método de biología molecular para la diferenciación de especies monoseriadas de la Sección Nigri

Mediante un RFLP *in silico* de la región que codifica para la calmodulina utilizando secuencias de cepas de colección pertenecientes a cada especie de la Sección, se determinaron dos enzimas, que, en paralelo, son capaces de diferenciar las tres especies de la Sección *Nigri*, *A. aculeatus*, *A. japonicus* y *A. uvarum*. En las figuras 2 y 3, se observan los patrones de bandas que se obtendrían en una electroforesis en gel de agarosa 0,8%, para las especies que presentan corte con las enzimas de restricción *HhaI* y *BsaHI*, respectivamente. El esquema presentado se obtiene mediante el software Nebcutter 2.0. Los tamaños de bandas obtenidas se pueden deducir utilizando la escala de tamaños mostrada a la izquierda de cada esquema.

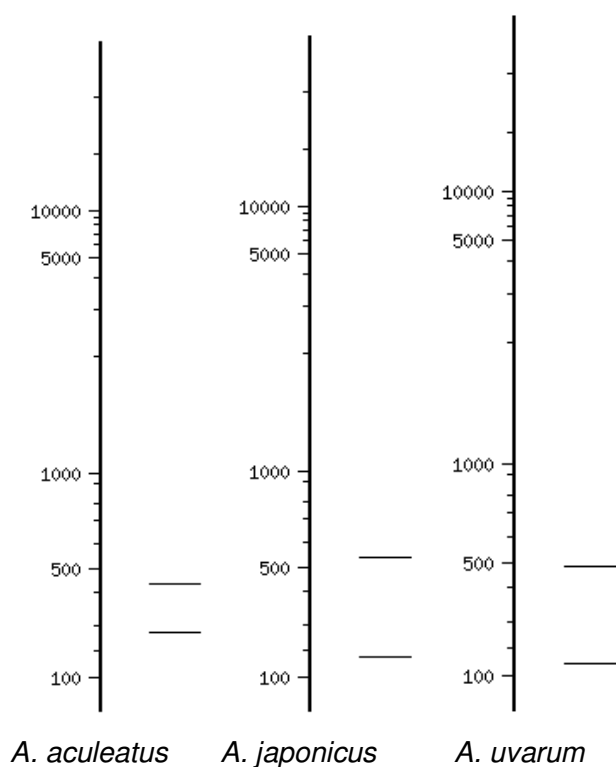
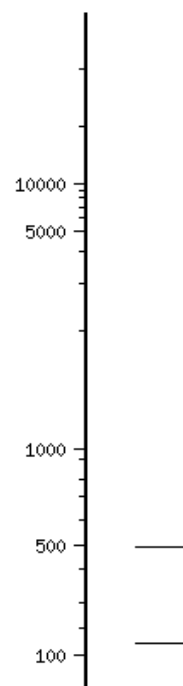


Figura 2. Patrón de bandas obtenido para RFLP del gen que codifica la calmodulina con *HhaI* para *A. aculeatus*, *A. japonicus* y *A. uvarum*

La enzima de restricción *HhaI* fue seleccionada para la diferenciación entre el grupo *A. japonicus*/ *A. uvarum* y la especie *A. aculeatus* mediante RFLP del gen que codifica para la calmodulina. En el caso de *A. japonicus* y *A. uvarum*, se obtienen dos fragmentos, uno de 540 pb y uno de menor tamaño de 150 pb, mientras que para *A. aculeatus* se observan dos fragmentos correspondientes a 420 pb y 250 pb.



A. uvarum

Figura 3. Patrón de bandas obtenido para RFLP del gen que codifica la calmodulina con *BsaHI* para *A. uvarum*

La enzima de restricción *BsaHI* fue seleccionada para diferenciar entre *A. aculeatus* /*A. japonicus* y la especie *A. uvarum*. En el caso de *A. aculeatus* y *A. japonicus*, no se espera corte con la enzimas de restricción, mientras que en el caso de *A. uvarum*, se obtiene un fragmento de 530 pb y uno de menor tamaño, de 150pb.

Desarrollo in silico de un método de biología molecular para la diferenciación de las especies pertenecientes al Agregado *A. niger*.

Para la identificación a nivel de especie de las cepas pertenecientes al grupo N se realizó un RFLP *in silico* del gen que codifica para la calmodulina, utilizando secuencias de cepas de colección pertenecientes a este grupo. Se determinó que la enzima de restricción *TruI* era capaz de realizar esta diferenciación. En la figura 4, se muestra el perfil esperado, determinado por el software Nebcutter 2.0, para las especies que generan corte con la enzima de restricción. Las bandas corresponden a los fragmentos esperados en electroforesis en gel de agarosa 0.8%. La escala de la izquierda muestra la ubicación según el tamaño del fragmento.

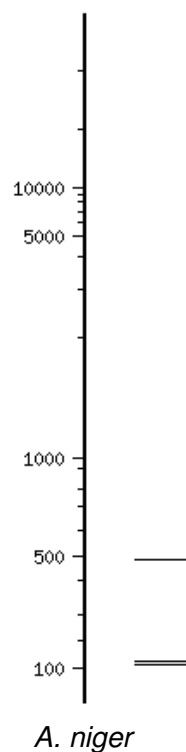


Figura 4. Patrón de bandas obtenido para RFLP del gen que codifica la calmodulina con *TruI* para *A. niger*

En el caso de *A. niger*, se observa un fragmento de 470 pb, y un fragmento de menor tamaño, de 100 pb, que quizás no sea observable en un gel real. En el caso de *A. foetidus* se espera un fragmento sin digerir de 700pb.

Para la identificación a nivel de especie de cepas pertenecientes al grupo T también se realizó, *in silico*, un RFLP del gen que codifica para la calmodulina utilizando cepas de colección pertenecientes al grupo T. Se determinó que la enzima de restricción *TruI* es capaz de realizar esta diferenciación. En la figura 5, se observa el patrón de bandas esperado.

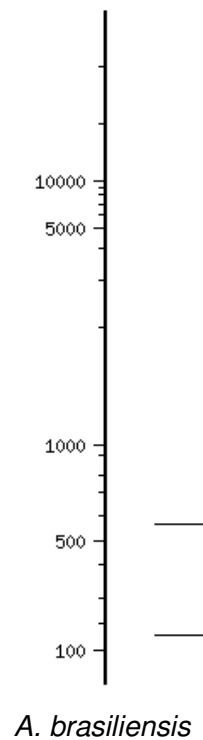


Figura 5. Patrón de bandas obtenido para RFLP del gen que codifica la calmodulina con *TruI* para *A. brasiliensis*

En el caso de *A. tubingensis* se espera un fragmento sin digerir de 700 pb fue esperado. En el caso de *A. brasiliensis*, se espera un fragmento de 550 pb y uno de menor tamaño, de 100 pb, que quizás no sea observable en un gel real.

Validación del método de biología molecular, desarrollado in silico, para la identificación de cepas pertenecientes a la Sección Nigri presentes en uva.

Validación del método de biología molecular, desarrollado in silico, para la diferenciación de especies monoseriadas, especies del Agregado A. niger y la especie A. carbonarius

El método desarrollado *in silico* fue validado aplicándolo a cepas de colección. En la figura 6, se muestra el producto de amplificación de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2, de 600pb, de las cepas de colección *Aspergillus japonicus* NRRL 1782, *Aspergillus aculeatus* NRRL 5094^T, *A. niger* NRRL 341^T, *A. tubingensis* NRRL 4875^T, *A. foetidus* NRRL 337, *A. brasiliensis* NRRL 26652^T y *A. carbonarius* NRRL 369^T.

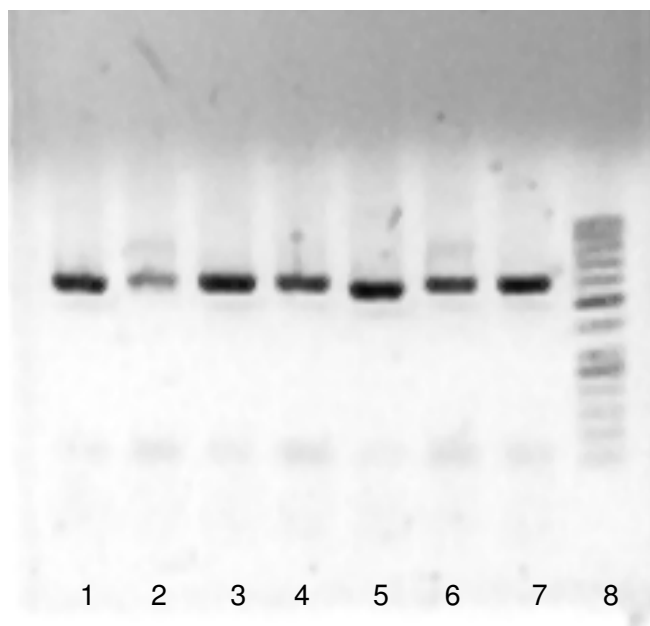


Figura 6. Producto de amplificación de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2. 1. *A. aculeatus*. 2. *A. brasiliensis*. 3. *A. carbonarius*. 4. *A. foetidus*. 5. *A. japonicus*. 6. *A. niger*. 7. *A. tubingensis*. 8. Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, ready to use, Fermentas)

En la figura 7, se muestra la validación del método, en el cual las cepas de colección *Aspergillus japonicus* NRRL 1782, *Aspergillus aculeatus* NRRL 5094^T, *A. niger* NRRL 341^T, *A. tubingensis* NRRL 4875^T, *A. foetidus* NRRL 337, *A. brasiliensis* NRRL 26652^T y *A. carbonarius*

NRRL 369^T fueron sometidas al RFLP de la región ITS1 - 5.8SrDNA-ITS2 con la enzima de restricción *BsaHI*.

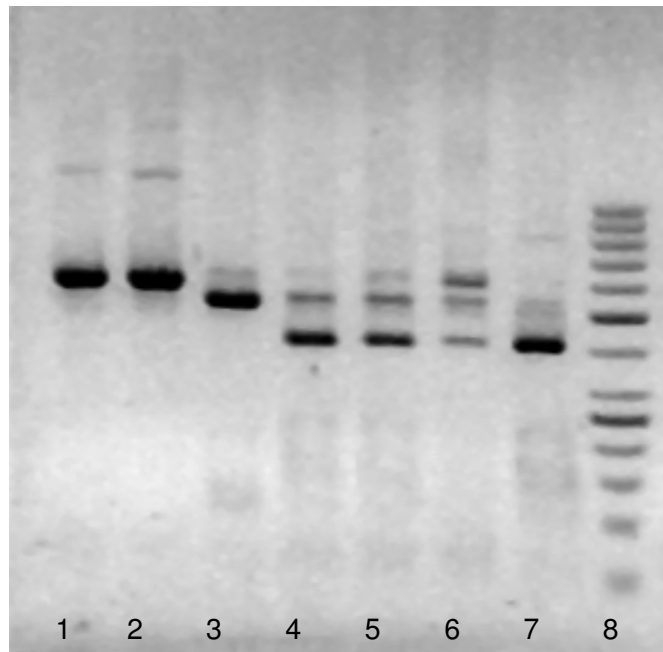


Figura 7. RFLP de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2. 1. *A. aculeatus*. 2. *A. japonicus*. 3. *A. carbonarius*. 4. *A. foetidus*. 5. *A. niger*. 6. *A. brasiliensis*. 7. *A. tubingensis*. 8. Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, ready to use, Fermentas)

El resultado obtenido fue el esperado. No hubo corte con la enzima de restricción en el caso de las especies monoseriadas *A. aculeatus* y *A. japonicus*, por lo que luego del RFLP de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2, se mantuvo el amplicón de 600pb. En el caso de *A. carbonarius* se obtuvo el fragmento esperado de 500 bp. Para las especies el agregado *A. niger* también se obtuvo el perfil esperado. El fragmento de 385 pb puede observarse, mientras que el fragmento de 120 pb se observa con poca nitidez en el gel. Para las especies *A. foetidus*, *A. niger* y *A. brasiliensis*, se observa que la digestión del amplicón fue parcial. Por lo que se ven bandas de mayor peso que el fragmento más grande esperado. Esto no invalida el resultado obtenido. Para evitar la digestión parcial podrían variarse las condiciones de restricción o la cantidad de ADN utilizado.

Validación del método de biología molecular, desarrollado in silico, para la identificación de especies monoseriadas de la Sección Nigri

En la figura 8, se muestra el producto de amplificación de la región que codifica para la calmodulina, de 700pb, de las cepas de colección *Aspergillus japonicus* NRRL 1782, *Aspergillus aculeatus* NRRL 5094^T, *A. niger* NRRL 341^T, *A. tubingensis* NRRL 4875^T, *A. foetidus* NRRL 337, *A. brasiliensis* NRRL 26652^T y *A. carbonarius* NRRL 369^T.

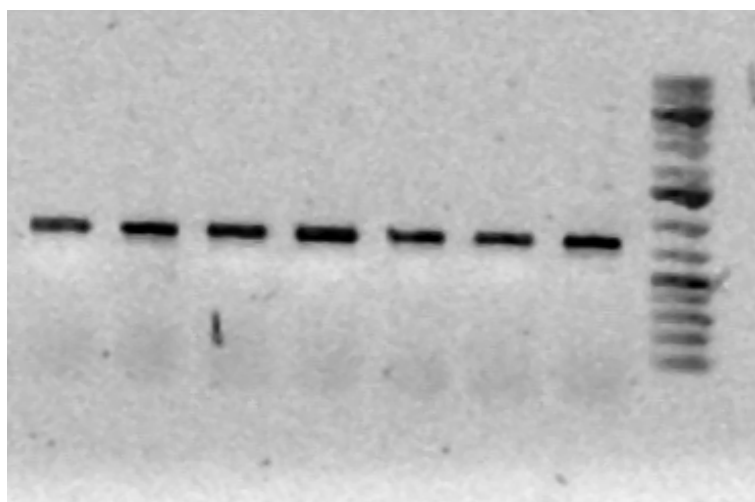


Figura 8. Producto de amplificación de la región que codifica para la calmodulina. 1. *A. aculeatus*. 2. *A. brasiliensis*. 3. *A. carbonarius*. 4. *A. foetidus*. 5. *A. japonicus*. 6. *A. niger*. 7. *A. tubingensis*. 8. Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA ladder, Fermentas)

En la figura 9, se muestra la validación del método, en el cual el RFLP de la región que codifica para la calmodulina con las enzimas *HhaI* y *TruI* fue aplicado las cepas de colección *Aspergillus japonicus* NRRL 1782 y *Aspergillus aculeatus* NRRL 5094^T.

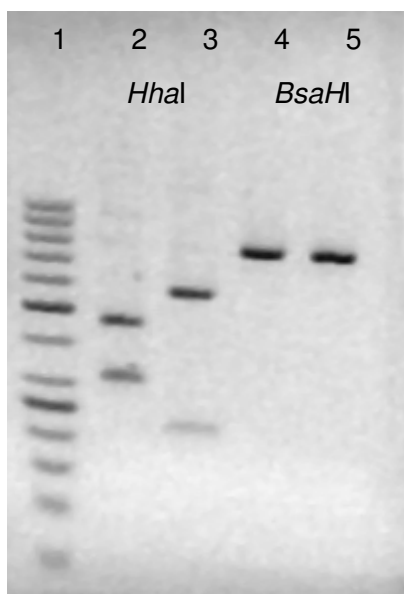


Figura 9. RFLP de la región que codifica para la calmodulina. 1. Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, ready to use, Fermentas). 2. *A. aculeatus*, *HhaI*. 3. *A. japonicus*, *HhaI*. 4. *A. aculeatus*, *BsaHI*. 5. *A. japonicus*, *BsaHI*

El resultado obtenido fue el esperado. Fue posible diferenciar entre las especies *A. aculeatus* y *A. japonicus* utilizando la enzima de restricción *HhaI*. En el primer caso se obtuvieron los dos fragmentos esperados, de 420 pb y 250 pb. En el segundo caso, el perfil obtenido estuvo integrado por dos fragmentos, de 540pb y 150 bp, respectivamente, de acuerdo a lo esperado. A su vez, estas dos especies generaron el mismo perfil con la enzima de restricción *BsaHI*, al no realizarse corte con la enzima.

Validación del método de biología molecular, desarrollado *in silico*, para la identificación de las especies pertenecientes al Agregado *A. niger*.

El método desarrollado *in silico*, para la identificación de especies del grupo N, fue validado aplicándolo a las cepas de colección *A. niger* NRRL 341^T, *A. foetidus* NRRL 337, como se muestra en la figura 10.

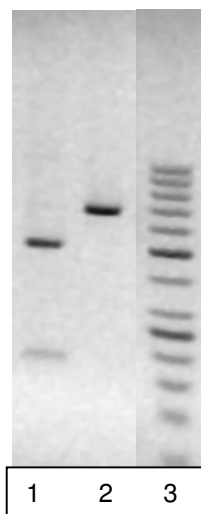


Figura 10. RFLP de la región que codifica para la calmodulina. 1. *A. niger*. 2. *A. foetidus*. 3. Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, ready to use, Fermentas).

En este caso también se confirmó lo esperado a partir del RFLP *in silico*. En el caso de *A. niger* se obtuvo un fragmento de 470 pb y un fragmento de menor tamaño de aproximadamente 200 pb, mientras que para *A. foetidus* no hubo corte con la enzima de restricción.

Posteriormente, el método desarrollado *in silico* para la identificación de especies del grupo T, fue validado aplicándolo a las cepas de colección *A. tubingensis* NRRL 4875^T y *A. brasiliensis* NRRL 26652^T, como se muestra en la figura 11.

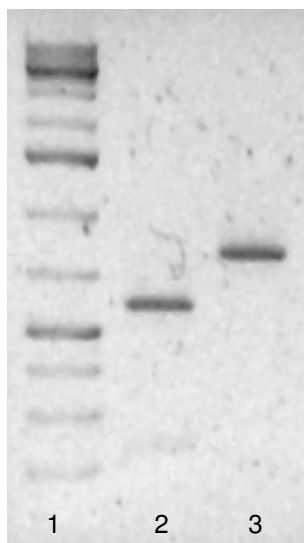


Figura 11. RFLP de la región que codifica para la calmodulina. 1. *A. brasiliensis*. 2. *A. tubingensis*. 3. Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentas).

El resultado obtenido también fue el esperado. Para la especie *A. tubingensis* no hubo corte con la enzima de restricción, mientras que para *A. brasiliensis*, se obtuvo un fragmento de 550 pb y un fragmento de menor tamaño, el cual se observa con poca nitidez.

Los resultados obtenidos confirman la validez del método desarrollado para la diferenciación entre especies de la Sección *Nigri* de *Aspergillus*. El método es sencillo y rápido y permite obtener resultados en dos días de trabajo. Es aplicable en el contexto descrito, o sea para aislamientos cuya pertenencia a la Sección *Nigri* de *Aspergillus* ha sido previamente determinada. Resulta muy útil cuando el número de aislamientos a estudiar es elevado, ya que no se depende de la reacción de secuenciación, disminuyendo el costo y tiempo del análisis.

Métodos de extracción, purificación, detección y cuantificación de OTA

Método de detección cualitativa de OTA

Puesta a punto de TLC

La técnica de TLC para la detección cualitativa se hizo de acuerdo a AOAC (1990). Se determinó el límite de detección para ocratoxina A estándar. En la tabla 4 se muestran las cantidades sembradas y la detección correspondiente.

ng OTA	125	62,5	25	12,5	6,25	3,125	2,5	1,25	0,625	0,5	0,25	0,125
Detección cualitativa	si	si	si	si	si	si	si	si	no	no	no	no

Tabla 4. Detección cualitativa por TLC

Se determinó que la mínima cantidad de OTA estándar detectada por TLC fue de 1.25ng. Si se aplicara el método descrito en AOAC (1990) para la detección de OTA en café (975.38), sería posible detectar un vino contaminado con 2ppb. El método implicaría extraer 10 mL de vino con cloroformo en condiciones ácidas, evaporar el solvente del extracto y luego reconstituir en 300µL de metanol. En esas condiciones habría que sembrar por lo menos 20 µL del extracto en la placa de TLC para detectar la OTA contenida en una muestra contaminada con el límite establecido por la OIV. Este podría ser un método sencillo para la detección de vinos que no cumplan la normativa establecida por la OIV.

Puesta a punto del método HPLC- FID para la cuantificación de OTA

Se optimizaron las condiciones de corrida para la cuantificación de ocratoxina A estándar. El flujo de fase móvil fue optimizado en 0.9 ml/min. En estas condiciones el tiempo de retención varió entre 7.5 y 8 minutos. En la figura 12, se muestra el cromatograma obtenido para OTA estándar de concentración 21.7 ppb.

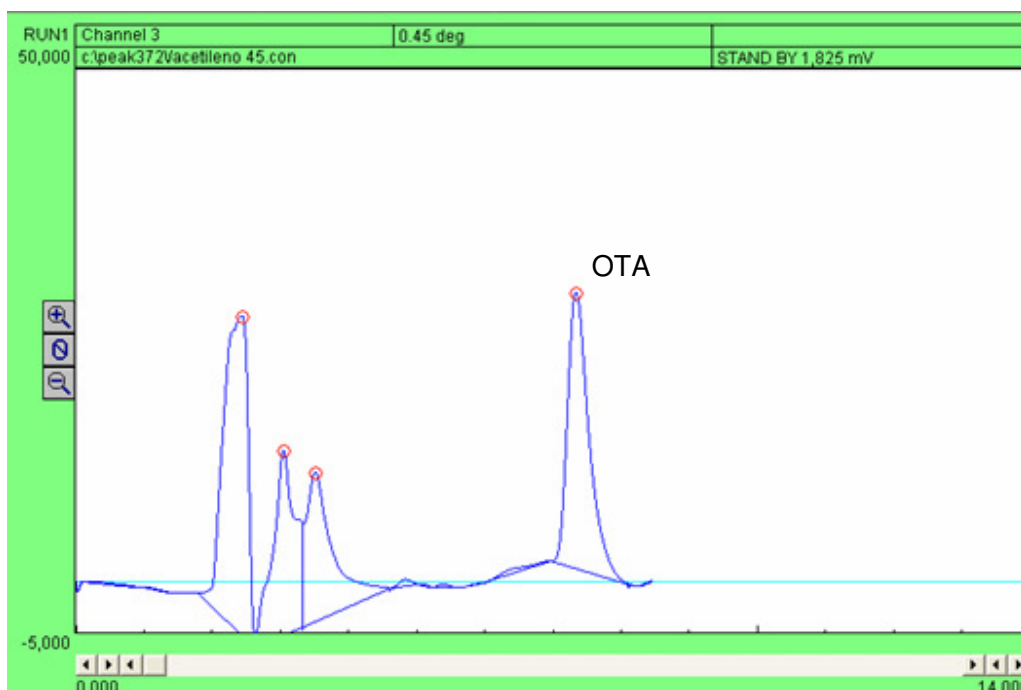


Figura 12. OTA estándar 21.7 ppb

Se construyó la curva de calibración abarcando el rango de concentraciones 0.28 – 21.7 ppb, la cual se muestra en la figura 13.

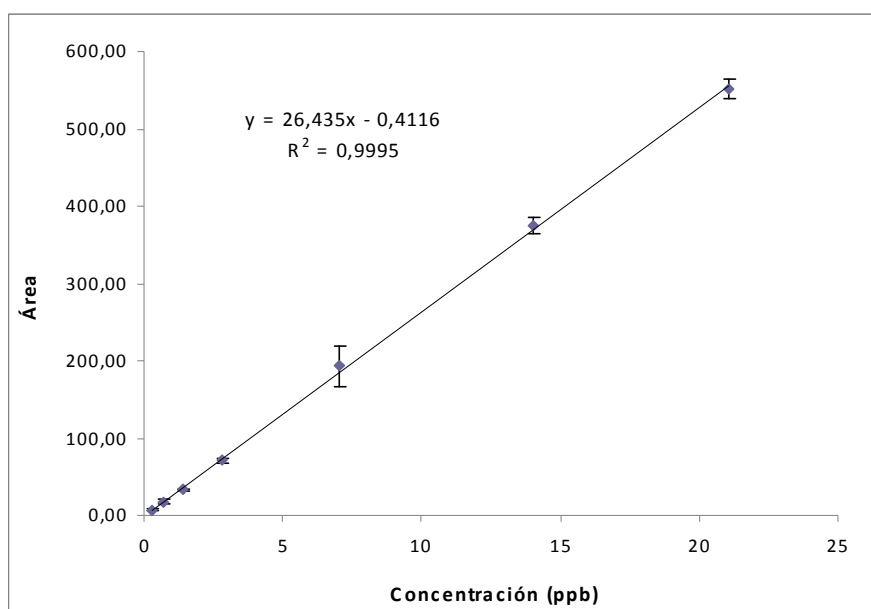


Figura 13. Curva de calibración para la cuantificación de OTA por HPLC- FID
Las barras representan los intervalos de confianza ($\alpha= 0.05$)

Métodos de extracción de OTA de jugo de uva y vino de la variedad Tannat

Determinación del límite de detección del método

Teniendo en cuenta el procedimiento involucrado en la extracción con cloroformo, el límite de detección del método de cuantificación por HPLC, el cual fue 0.28 ppb, se puede inferir que, partiendo de 10 mL de vino contaminado o 10 mL de jugo de uva, el límite de detección del método, en estas condiciones es de 0.0084 ng/ mL de vino o jugo. En el caso de partir de 50 g de uva contaminada, el límite de detección es de 0.0017 ng/g uva.

Sáez *et al.* (2004), utilizan la extracción cloroformo como método de extracción de OTA en vino. Si bien no se determina el límite de detección del método, la mínima concentración de OTA que detecta es de 0,1 ppb.

Determinación del porcentaje de recuperación de la extracción líquido-líquido

Se determinó el porcentaje de recuperación de la extracción líquido - líquido con cloroformo como solvente de extracción en medio ácido tanto para jugo de uva como para vino contaminado con una cantidad conocida de OTA. A partir de dicha concentración y de la metodología empleada, se calculó la concentración esperada de OTA en el extracto obtenido. A partir de la curva de calibración obtenida y de la respuesta generada por los extractos obtenidos se calculó la concentración de OTA en cada extracto. En la tabla 5 y 6 se muestran las concentraciones esperadas y las concentraciones obtenidas en cada extracto con su correspondiente intervalo de confianza y el porcentaje de recuperación para uva y vino respectivamente.

Conc. Inicial (ppb)	Conc esperada (ppb)	Conc. obtenida (ppb)	% recuperación
2	66,6	60 ± 6	88,5
10	333,3	184 ± 9	55,2

Tabla 5. % recuperación líquido-líquido en jugo de uva

Conc. Inicial (ppb)	Conc esperada (ppb)	Conc. obtenida (ppb)	% recuperación
2	66,6	59 ± 4	88,9
10	333,3	247 ± 6	74,2

Tabla 6. % recuperación líquido-líquido en vino

A partir de los cromatogramas obtenidos, se determinó que en ninguno de los casos se generaron solapamientos entre los componentes de la muestra y la OTA estándar, lo cual permite utilizar este método para cuantificar OTA en vinos y uvas.

El porcentaje de recuperación fue menor para jugos de uva contaminados con mayor concentración de OTA. Esto puede deberse a que la extracción con el solvente no fue completa, requiriéndose en este caso un número mayor de etapas de extracción.

Método de purificación

Determinación del porcentaje de recuperación de las columnas C18.

Se determinó el porcentaje de recuperación logrado utilizando las columnas de C18 para la purificación de jugo de uvas y vino de la variedad Tannat contaminado con concentraciones conocidas de OTA. En las tablas 7 y 8 se presentan los resultados obtenidos para cada caso.

Conc. Inicial (ppb)	Conc esperada (ppb)	Conc. obtenida (ppb)	% recuperación
0,2	0,5	nd	-
0,5	1,25	nd	-
1	2,5	nd	-
2	5	3,7	74
3	7,5	5,2	69

Tabla 7. % recuperación líquido-líquido en jugo de uva

Conc. Inicial (ppb)	Conc esperada (ppb)	Conc. obtenida (ppb)	% recuperación
0,2	0,5	nd	-
0,5	1,25	nd	-
1	2,5	nd	-
2	5	3.5	69
3	7,5	4.7	63

Tabla 8. % recuperación líquido-líquido en vino. nd: no hubo detección

Al igual que en el método de extracción líquido – líquido, a partir de los cromatogramas obtenidos, no se observaron solapamientos entre los componentes de la muestra y la ocratoxina A estándar.

De acuerdo a Tessini *et al.* (2010), el porcentaje de recuperación de este método alcanza el 93.7%, obteniendo resultados muy similares a los alcanzados con las columnas de inmunoafinidad (91.7%). Sin embargo, los resultados de la tesis demuestran que el porcentaje de recuperación de este método fue francamente inferior al método de extracción líquido – líquido. Para muestras contaminadas con igual concentración de OTA, el porcentaje de recuperación del método de extracción líquido - líquido resultó mayor que el obtenido al usar la columna C18. Si bien el método de purificación con columnas C18 es un método que evita el uso de cloroformo, es más costoso ya que requiere la compra de las columnas de C18, las cuales no pueden ser reutilizadas.

Por el contrario, el porcentaje de recuperación al utilizar el método de extracción con cloroformo determinado por Saez *et al.* 2004, fue menor al obtenido en esta tesis y dependiente de la matriz. Partiendo de una concentración de 1 ppb, Saez *et al.*, 2004, obtuvieron un porcentaje de recuperación de 73.4 % en vino tinto y del 55 % en jugo de uva. Si bien no determina el límite de detección, la mínima concentración de OTA que puede detectar es 0,1 ppb.

Debido a los porcentajes de recuperación obtenidos, se considera que el método a utilizar para la cuantificación de OTA en uvas y vinos podría ser, en primer lugar la extracción

de la toxina en medio ácido y con cloroformo como solvente de extracción y posterior cuantificación por HPLC- FLD.

Aislamiento e identificación de cepas
posibles productoras de ocratoxina A

Muestreo de uvas y aislamiento de cepas posibles productoras de OTA

La flora fúngica presente en las uvas analizadas no fue dependiente del momento de muestreo o la variedad muestreada. La flora predominante estuvo compuesta por hongos de los géneros *Alternaria* spp, *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp, *Cladosporium* spp., *Trichoderma* spp. y *Aspergillus* spp. En la Figura 14 se muestran los porcentajes de uvas contaminadas por cada hongo. Como puede observarse, *Aspergillus* spp. no fue flora predominante.

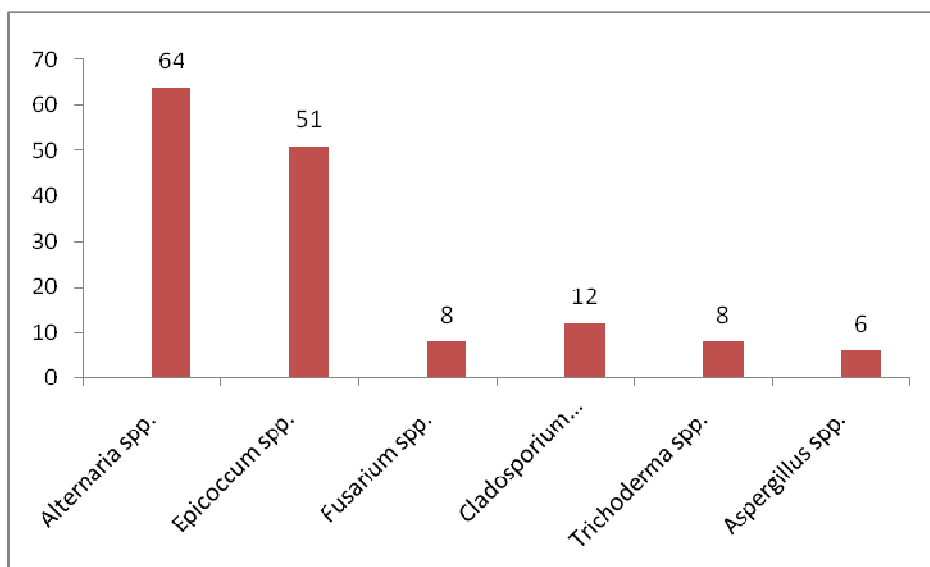


Figura 14. Porcentaje de uvas contaminadas por cada hongo

Fueron aisladas un total de 57 cepas de *Aspergillus* spp., todas pertenecientes a la Sección *Nigri* y posibles productoras de OTA. El 45% fue obtenido en el año 2006, el 11% en el año 2007, el 10% en el año 2008 y el 34 % en el año 2009 (Figura 15). En el anexo 4 se presenta el nombre de las cepas, la procedencia y el año de aislamiento.

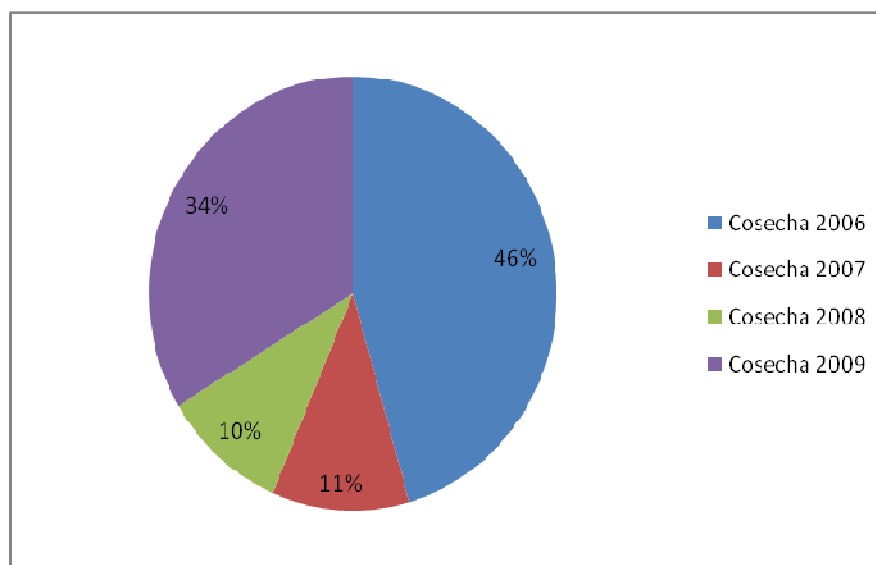


Figura 15. Porcentaje de *Aspergillus* spp. aislados por año.

En la figura 16 se muestran las precipitaciones acumuladas en el período de Agosto-Octubre y Octubre - Diciembre para los años 2005, 2006, 2007 y 2008; las precipitaciones acumuladas en el período Enero - Marzo para los 2006, 2007, 2008 y 2009 y las precipitaciones totales anuales para el período marzo 2005 – marzo 2006, marzo de 2006 – marzo 2007; marzo 2007 – marzo 2008 y marzo 2008- marzo 2009, extraídas del registro de precipitaciones del INIA (http://www.inia.org.uy/gras/agroclima/ppt_mapas/2007.html). En el período comprendido entre agosto – octubre, la viña está en la etapa de brotación, en el período noviembre- diciembre en la etapa de floración y el período enero- marzo es el período previo a la cosecha.

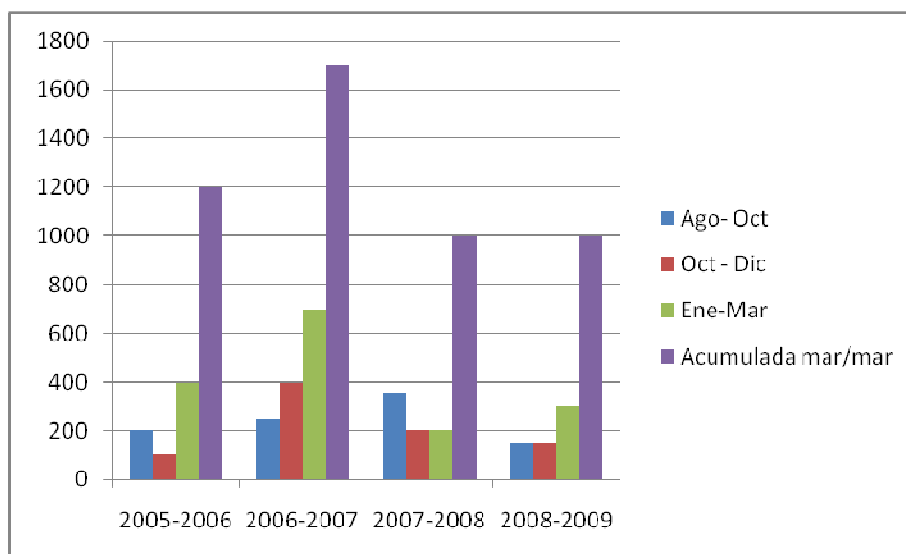


Figura 16. Precipitaciones acumuladas (mm)

No se observó relación entre las precipitaciones en el momento de cosecha y el porcentaje de cepas de *Aspergillus* aisladas cada año. En las cosechas 2006 y 2009, donde el porcentaje de cepas aisladas fue mayor (45 y 34% respectivamente), las precipitaciones en el momento de cosecha fueron menores a las del año 2007. Durante esta cosecha, el porcentaje de cepas aisladas fue del 11%. Sin embargo, en el año 2008, cuando las precipitaciones en el momento de cosecha fueron las más bajas de las cuatro cosechas ensayadas, el porcentaje de las cepas aisladas también fue el más bajo.

Tampoco se observó relación entre las precipitaciones totales anuales y la cantidad de cepas aisladas cada año. Las precipitaciones totales anuales mayores se produjeron en el período marzo de 2006 – marzo de 2007, mientras que en la cosecha 2007, el porcentaje de cepas aisladas fue bajo. Las precipitaciones totales anuales en los períodos marzo 2007 – marzo 2008 y marzo 2008 – marzo 2009, fueron similares, sin embargo el porcentaje de cepas aisladas fue de 10 y 34% respectivamente.

De acuerdo a la bibliografía consultada no hay consenso respecto a la influencia de las precipitaciones acumuladas y la incidencia de *Aspergillus* en uvas. Battilani *et al.* (2006) determinaron que las condiciones climáticas son muy influyentes en la presencia fúngica y la contaminación por OTA en racimos. Demostraron, además, que existe una correlación

positiva entre la presencia de *Aspergillus* en el momento de cosecha y las altas temperaturas y una correlación negativa con respecto a las precipitaciones acumuladas durante el invierno y la cosecha. Sin embargo, Belli *et al.* (2005) encontraron una correlación positiva entre la ocurrencia de *Aspergillus* en uvas y las precipitaciones acumuladas. A su vez, Leong *et al.* (2006a) postularon que precipitaciones en el momento de la cosecha, ocasionan un aumento de la incidencia de *Aspergillus*. En el momento de la cosecha, la concentración de azúcar dentro de la baya es muy alta. Precipitaciones en ese momento, provocan que, con el fin de igualar la presión osmótica dentro y fuera de la baya, mucha agua ingrese a la baya, causando rotura del hollejo y un lugar de ingreso de la enfermedad (Leong *et al.*, 2006a). Leong *et al.* (2006a) hace énfasis en que para que se desarrolle la enfermedad ocasionada por *Aspergillus* es necesario, además de la presencia del inóculo, que haya herida en las bayas. Una vez que las bayas son infectadas por *Aspergillus*, la producción o no de OTA en las uvas dependerá de las condiciones ambientales (Leong *et al.*, 2006a).

Durante la cosecha 2009, el muestreo se extendió a viñedos comerciales del sur del país, abarcando los departamentos de San José, Maldonado, Florida, Canelones y Colonia. Dicho muestreo se centró en la variedad Tannat. Se pudo determinar que el porcentaje de *Aspergillus* spp. aislados fue dependiente de la ubicación del viñedo. En el caso de viñedos cercanos a la costa (San José, Maldonado y Colonia), ningún aislamiento de *Aspergillus* spp. fue obtenido. Todos los aislamientos de *Aspergillus* fueron obtenidos de viñedos alejados de la costa (Canelones, Sauce y Florida), como puede observarse en la Figura 17.

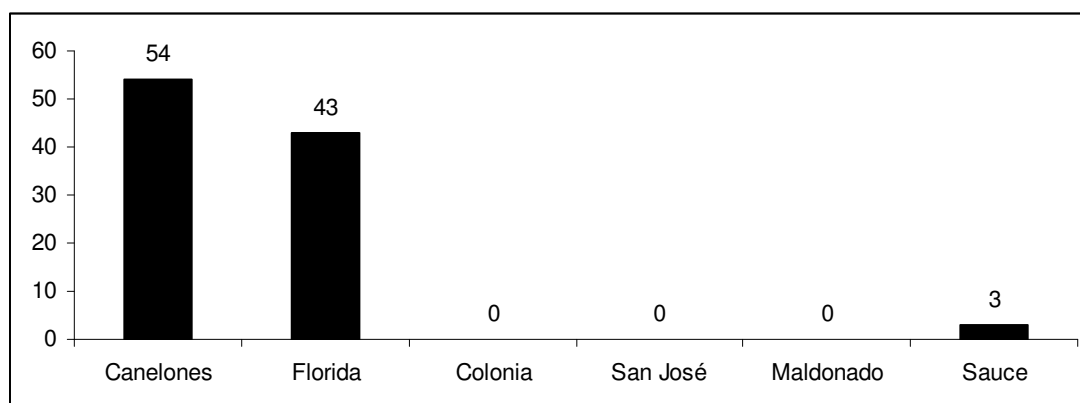


Figura 17. Porcentaje de *Aspergillus* aislados por departamento en 2009.

En el caso de los viñedos alejados de la costa, se cumple que las temperaturas son mayores que en viñedos cercanos a la costa (<http://www.meteorologia.gub.uy/index.php/caracteristicas-climaticas>). Estos resultados están de acuerdo con lo expuesto por varios autores (Pietro *et al.*, 2001; Serra *et al.*, 2003; Sage *et al.*, 2004; Belli *et al.*, 2006) quienes demostraron que la cantidad de cepas ocratoxigénicas y los niveles de OTA son mayores en uvas y vinos producidos en áreas con condiciones climáticas más templadas y alejadas de la costa.

Fue posible realizar el recuento de hongos filamentosos y levaduras presentes en la cáscara de la uva muestreada durante la cosecha 2009. En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos. En dos casos fue posible realizar también, el recuento de cepas pertenecientes al género *Aspergillus*.

Dpto/ Momento	Hongos (ufc/g)	Levaduras(ufc/g)	<i>Aspergillus</i> (ufc/g)
Cosecha/Canelones	6×10^3	3.6×10^5	150
Cosecha/San José	< 100	3.8×10^4	< 100
Cosecha/Florida	4.8×10^3	6.8×10^5	2.5×10^3
Cosecha/Colonia	2.1×10^3	2.7×10^5	< 100
Cosecha/Maldonado	1.3×10^4	4×10^6	< 100
Cosecha/ Atlántida	2×10^4	8×10^5	< 100

Tabla 9. Recuento de hongos filamentosos y levaduras en uva

Fue posible aislar cepas de *Aspergillus* directamente de uvas, en muestras provenientes de varios viñedos. Sin embargo, solamente en algunas de ellas fue detectada la presencia de *Aspergillus* mediante recuento en placa. Estos resultados evidencian que en la mayoría de los casos, se trata de contaminaciones puntuales en determinados granos del racimo. Sin embargo, estos resultados no eliminan el riesgo de presencia de OTA en vino, ya que según Díaz *et al.* (2009) partiendo de un 0.5% de uvas contaminadas con *Aspergillus carbonarius*, se obtiene un vino con niveles de OTA que superan el límite máximo de contaminación aceptado por la OIV de 2 ppb. Estas evidencias hacen necesario un método más sensible que el

recuento en placa para la cuantificación de inóculo sobre la uva utilizada como materia prima, el cual permita predecir el riesgo de contaminación con OTA del vino a elaborar. Aún el recuento de uvas contaminadas no es factible ya que para detectar un 0.5% de contaminación habría que sembrar como mínimo, 200 uvas por muestra.

Identificación fenotípica a nivel de especie de cepas de *Aspergillus* pertenecientes a la Sección *Nigri* aisladas

De acuerdo a la observación microscópica, se determinó que el 39% de las cepas aisladas de uvas uruguayas eran monoseriadas, por lo que fueron clasificadas como pertenecientes al grupo integrado por las especies *A. japonicus*, *A. uvarum* y *A. aculeatus*. El 61% restante fueron clasificadas como biseriadas. En la figura 18, se muestra la foto de la observación microscópica de la cepa monoseriada 09Sa1 y de la cepa biseriada 09Flo6. En cada caso se observan hifas conidióforas en las que se observan fiálides y métulas en el caso de la cepa biseriada y sólo fiálides en el caso de la cepa monoseriada.

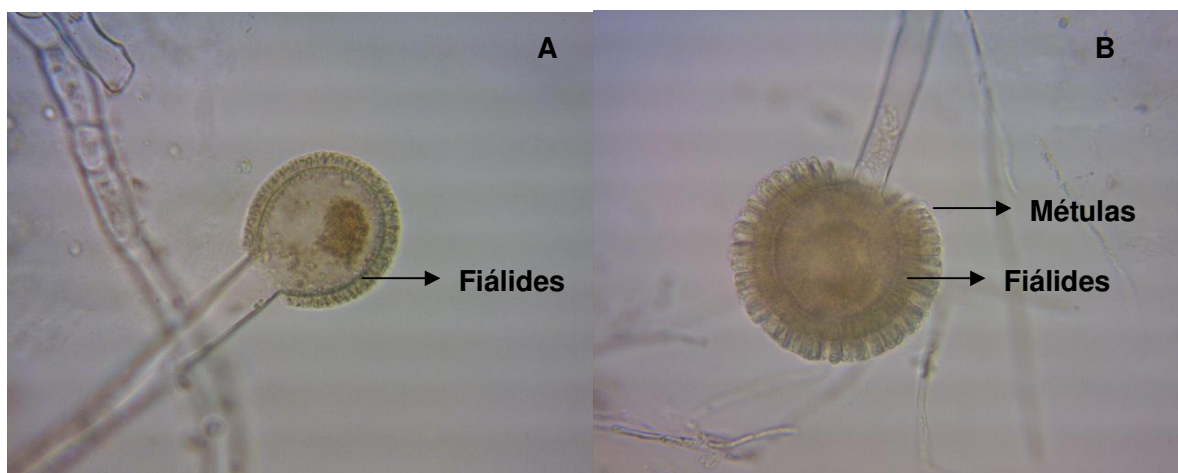
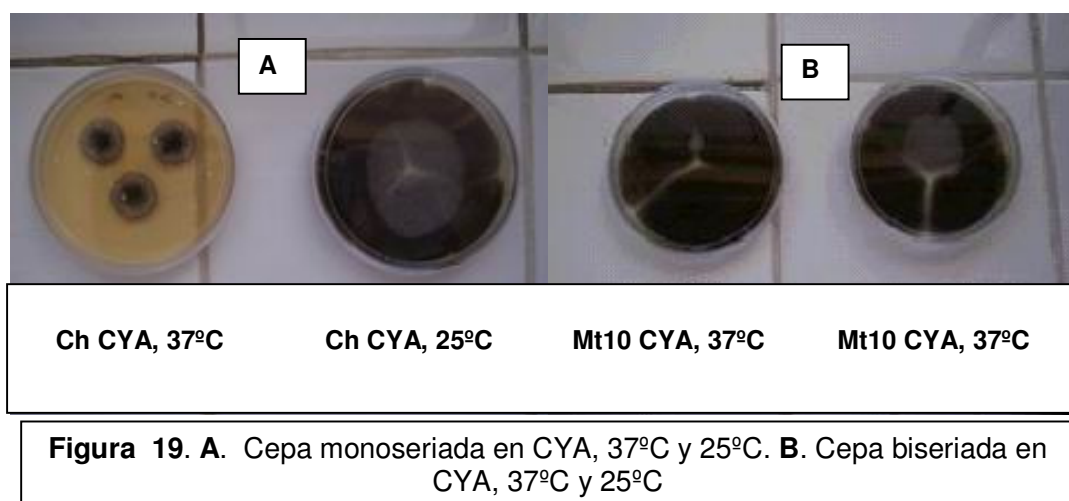


Figura 18. A. Foto de observación microscópica con aumento de 400 de frescos obtenidos de cultivos en PDA de la cepa monoseriada 09Sa1(A) y la cepa biseriada 09Flo6, pertenecientes a la Sección *Nigri*

De acuerdo a las claves empleadas para la identificación fenotípica, todas las cepas biseriadas fueron clasificadas como pertenecientes al agregado *A. niger*. Según la identificación fenotípica, ninguno de los aislamientos correspondió a la especie *A. carbonarius*. En la figura 19 se muestran fotos de una cepa monoseriada (06Ch) y una biseriada (06Mt 10) en medio de cultivo CYA a 25°C y 37°C.



Una de las principales diferencias entre los grupos de especies, es el crecimiento a 37°C. Para el caso de especies monoseriadas, la velocidad de crecimiento a 37°C es mucho menor que para las especies del agregado *A. niger*. Mientras que el diámetro de la colonia para especies monoseriadas se puede medir y es menor a 3cm, el diámetro de la colonia para especies el agregado *A. niger* abarca toda la placa. El comportamiento de la especie *A. carbonarius*, en estas condiciones de crecimiento, es similar al de las especies monoseriadas. Por lo tanto, para diferenciar entre las especies monoseriadas y *A. carbonarius*, de forma fenotípica, es muy importante tener en cuenta la observación microscópica, ya que *A. carbonarius* es biseriado.

En el anexo 5 se presentan los resultados obtenidos de los crecimientos a diferentes temperaturas en diferentes medios de cultivo.

Identificación de las cepas aisladas mediante el método de biología molecular desarrollado

Diferenciación de especies monoseriadas, especies del Agregado A. niger y A. carbonarius

El método desarrollado fue aplicado a las cepas aisladas de uvas. Fue confirmado que el 39 % de las cepas eran monoseriadas y el 61 % restante pertenecientes al agregado *A. niger*. A su vez, se confirmó que ningún aislamiento perteneció a la especie *A. carbonarius*. En la figura 20 se observa el RFLP de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2 para once cepas monoseriadas, a partir del cual se constata que no hubo cortes con la enzima de restricción utilizada, lo cual confirma su pertenencia al grupo *A. japonicus*/ *A. aculeatus*/ *A. uvarum*.

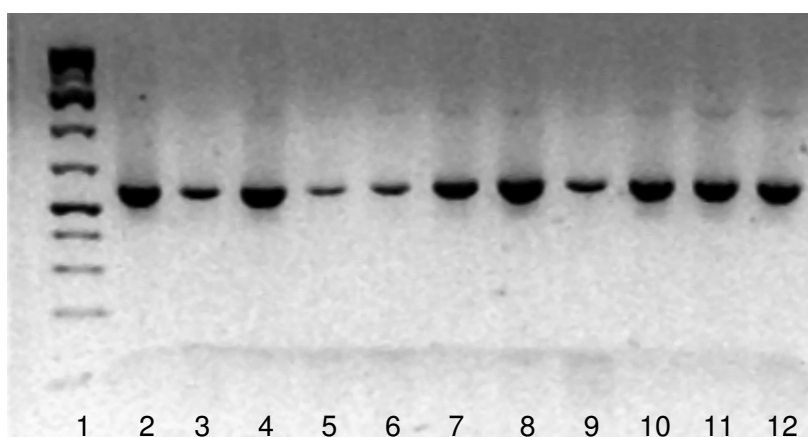


Figura 20. RFLP de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2. 1. Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb DNA ladder, Fermentas). 2. 09Ca3. 3. 09Ca5. 4. 09Ca7. 5. 09Ca9. 6. 06Mt1. 7. 06Mt2. 8. 06Mt3. 9. 06Mt4. 10. 06Mt8. 11. 09Flo8. 12. 06Ch

En la figura 21 se muestra el método aplicado para tres cepas monoseriadas y dos pertenecientes al agregado *A. niger*.

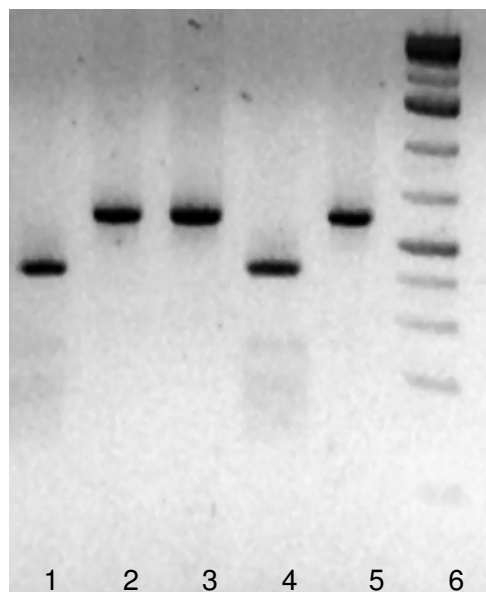


Figura 21. RFLP de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2. 1. 09Ca2. 2. 09Ca4. 3. 06Mt4. 4. 06Mt10. 5. 09Sa1. 6. Marcador de peso molecular (GeneRuler TM1Kb DNA ladder, Fermentas)

El método desarrollado, es un método fácil y rápido, a través el cual se puede realizar la diferenciación entre especies monoseriadas, especies el agregado *A. niger* y *A. carbonarius*. Esta diferenciación se realiza mediante una amplificación por PCR y un posterior RFLP de la región amplificada. Este método sustituye al método de diferenciación fenotípica, el cual es más laborioso y más tedioso.

Identificación de las cepas monoseriadas aisladas de uva

Las cepas monoseriadas fueron identificadas utilizando el método basado en el RFLP del gen de la calmodulina, desarrollado en esta misma tesis. En las figuras 22 y 23 se muestran los perfiles obtenidos utilizando las enzimas de restricción *BsaHI* y *HhaI* respectivamente.

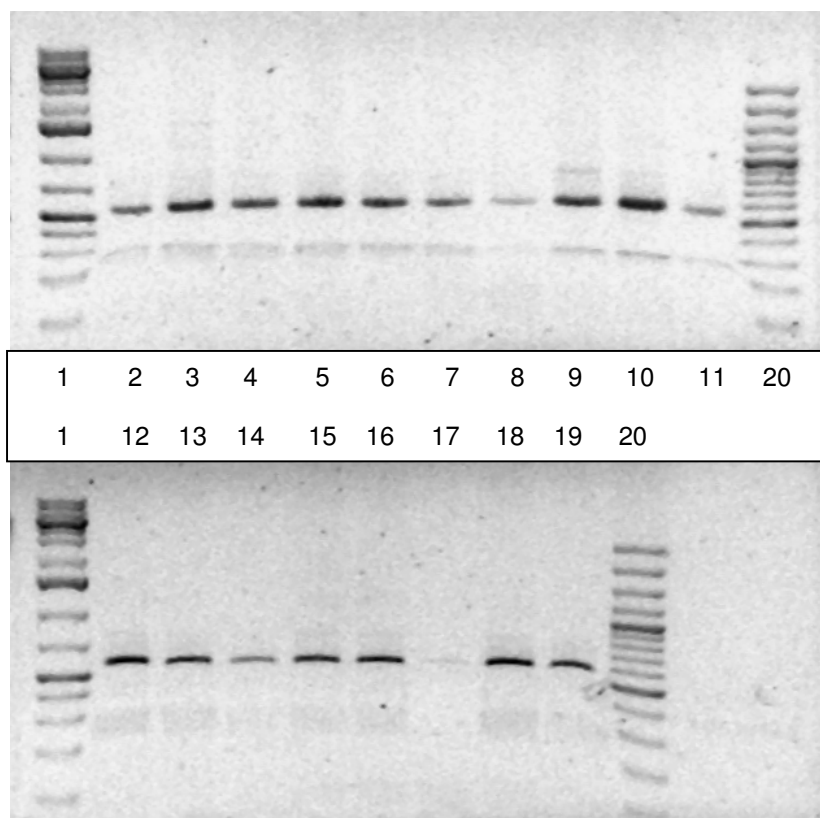


Figura 22. RFLP de la región que codifica para la calmodulina con *Bsa*HI. 1. Marcador molecular (GeneRuler™1Kb DNA ladder, Fermentas). 2. 06Mt1. 3. 06Mt2. 4. 06Mt3. 5. 06Mt4. 6. 06Mt5. 7. 06Mt8. 8. 06Mt9. 9. 06Mt13. 10. 06 Mt14. 11. 06Ch. 12. 09Tt2. 13. 09Ca3. 14. 09Ca4. 15. 09Ca5. 16. 09Ca7. 17. 09Ca9. 18. 09Ca10. 19. 09Flo8. 20. 09Sa1. 20. Marcador molecular (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas)

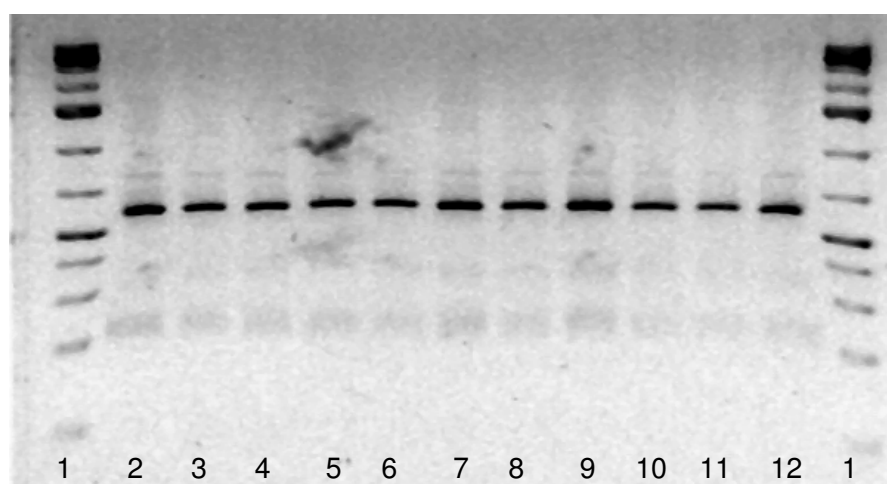


Figura 23. RFLP de la región que codifica para la calmodulina con *Hha*I. 1. Marcador molecular (GeneRuler™1Kb DNA ladder, Fermentas). 2 09Ca3. 3. 09Ca5. 4. 09Ca7. 5. 09Ca9. 6. 06Mt1. 7. 06Mt2. 8. 06Mt3. 9. 06Mt4. 10. 06Mt8. 11. 06Ch. 12. 09Flo8

Todas las cepas monoseriadas fueron identificadas como *A. uvarum* debido a que luego del RFLP de la región que codifica para la calmodulina con la enzima de restricción *BsaHI* se obtuvo un fragmento de 530 pb, mientras que un fragmento de 540 pb fue obtenido al utilizar *HhaI* como enzima de restricción. En ambos casos se observó el fragmento de menor tamaño, pero con muy poca nitidez.

Caracterización molecular de cepas pertenecientes al agregado A. niger aisladas de uva

Las cepas aisladas de uva y pertenecientes al agregado *A. niger* fueron clasificadas en pertenecientes al grupo N o T mediante RFLP de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2 con la enzima de restricción *RsaI* de acuerdo al método desarrollado por Bau *et al.* (2006). Las cepas pertenecientes al grupo N fueron caracterizadas por la obtención de dos fragmentos de restricción, de 520 y 80 pb respectivamente luego del RFLP. Por el contrario, las del grupo T fueron caracterizadas por la obtención un fragmento sin digerir (600pb).

Para todas las cepas pertenecientes al agregado *A. niger*, se obtuvo un amplicón de 600pb correspondiente a la región ITS1-5.8SrADN-ITS2. Sin embargo luego del corte con enzimas de restricción con la enzima *RsaI*, dos perfiles diferentes fueron obtenidos, según los aislamientos analizados, los cuales pueden ser observados en la Figura 24.

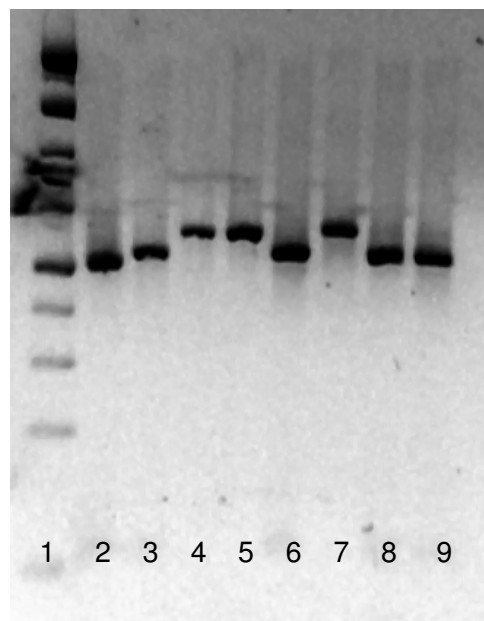


Figura 24. RFLP de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2 con RsaI. 1. Marcador de peso molecular (GeneRuler TM1Kb DNA ladder, Fermentas). 2. 09Flo5, grupo N. 3. 06AV7, grupo N. 4. 07. TtD1, grupo T. 5. 07TtD3, grupo T. 6. 06AV3, grupo N. 7. 06AVS20, grupo T. 8. 08At3, grupo N. 9. 07SB2, grupo N.

Como puede apreciarse, en tres de los casos, la enzima de restricción no realizó el corte y por lo tanto esas cepas fueron clasificadas como pertenecientes al grupo T. En el segundo perfil la enzima de restricción realizó el corte, obteniéndose un fragmento de 520 pb y fragmentos más pequeños que no se pueden observar en el gel. Este perfil se repitió en el resto de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger*, los cuales fueron clasificados como pertenecientes al grupo N. Por lo tanto, tres cepas pertenecientes al agregado *A. niger* fueron clasificadas como pertenecientes al grupo T; y 32 como pertenecientes al grupo N. Este resultado es interesante ya que de acuerdo a lo expuesto por Bau *et al.* (2006) todas las cepas pertenecientes al grupo N son capaces de producir OTA en medio de cultivo.

Identificación a nivel de especie de las cepas pertenecientes al agregado A. niger

Las cepas caracterizadas como pertenecientes al grupo N, fueron identificadas a nivel de especie utilizando el método basado en el RFLP del gen de la calmodulina, desarrollado en esta tesis. Veintinueve cepas fueron identificadas como *A. niger* y tres como *A. foetidus*

debido a partir de las primeras se obtuvo un fragmento de 470 pb y dos fragmentos de menor tamaño de aproximadamente 150 y 100pb, mientras no hubo corte con la enzima en el caso de las segundas. En la figura 25, se muestran los perfiles obtenidos para dos cepas identificadas como *A. foetidus* y nueve cepas identificadas como *A. niger*.

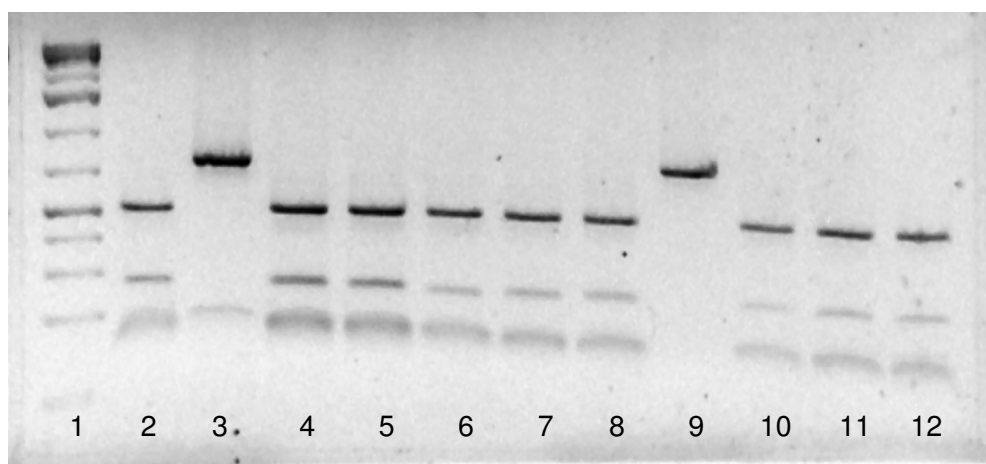


Figura 25. RFLP de la región que codifica para la calmodulina conTrul, GrupoN. 1. Marcador de peso molecular (GeneRuler™1Kb DNA ladder, Fermentas). 2. 06AV2, *A. niger*. 3. 06AV3, *A. foetidus*. 4. 06AV4, *A. niger*. 5. 06AV5, *A. niger*. 6. 06AV7, *A. niger*. 7. 07SB1, *A. niger*. 8. 07SB2, *A. niger*. 9. 07TtD2, *A. foetidus*. 10. 08At1, *A. niger*. 11. 08At2, *A. niger*. 12. 08At2, *A. niger*.

Las tres cepas clasificadas como pertenecientes al grupo T, fueron identificadas a nivel de especie, utilizando el método desarrollado en esta tesis. De acuerdo a los resultados, las mismas fueron identificadas como *A. tubingensis*, debido a que no hubo corte con la enzima de restricción, como se muestra en la figura 26.

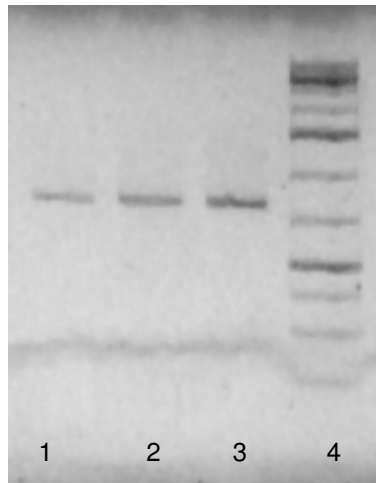


Figura 26. RFLP de la región que codifica para la calmodulina conTruI, Grupo T. 1. 07 TtD1, *A. tubingensis*. 2. 06AVS20, *A. tubingensis*. 3. 07TtD3, *A. tubingensis*. 4. Marcador de peso molecular (GeneRuler™1Kb DNA ladder, Fermentas)

En resumen, las cepas aisladas fueron identificadas de la siguiente manera: 22 como *A. uvarum*, 29 como *A. niger*, 3 como *A. foetidus* y 3 como *A. tubingensis*. Ningún aislamiento de *A. carbonarius* fue obtenido. En la figura 27 se muestran los porcentajes de cada especie.

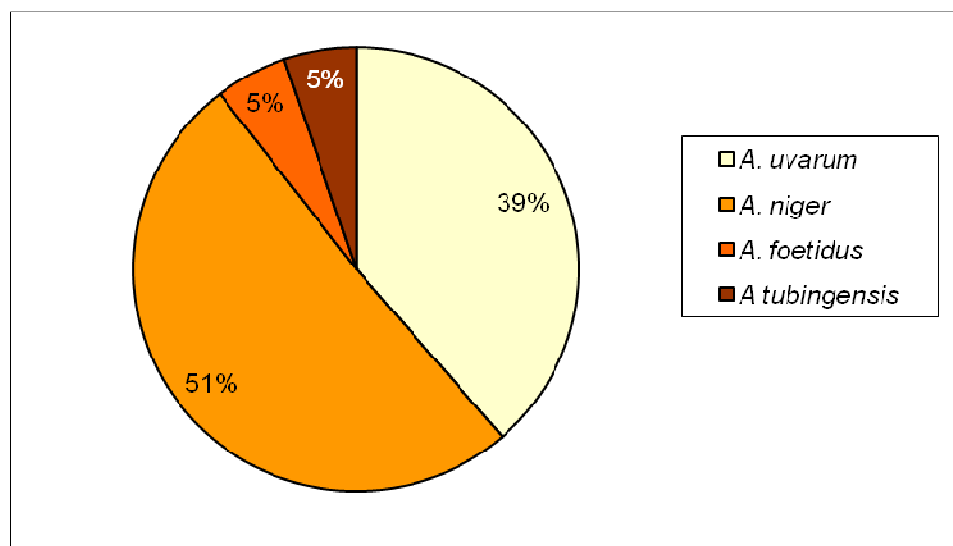


Figura 27. Porcentaje de especies aisladas

Con respecto a las especies del agregado *A. niger*, la mayoría de las cepas obtenidas

fueron clasificadas como pertenecientes al grupo N y por lo tanto potenciales productores de OTA de acuerdo a Bau *et al.* (2006). Sin embargo, la capacidad de producir OTA por cepas de estas especies, es reconocidamente inferior a la de *A. carbonarius* (Bau *et al.*, 2005; Esteban *et al.*, 2004). Solamente tres de las cepas aisladas en este trabajo, fueron clasificadas como pertenecientes al grupo T y más específicamente identificadas como *A. tubingensis*. La mayoría de los aislamientos de esta especie no son productores de OTA, sin embargo se han detectado algunos casos en los cuales la producción de OTA fue verificada. En esos casos, los aislamientos son clasificadas como *A. tubingensis* –like de acuerdo a Martínez Culebras y Ramón (2007).

Si bien la mayoría de los trabajos realizados en Europa concuerdan en que las especies monoseriadas no son productoras de OTA, existen trabajos que han evidenciado la capacidad de producir OTA por parte de *A. japonicus* y *A. aculeatus*. Esta capacidad ha sido muy dependiente de la cepa y en todos los casos la OTA ha sido detectada en baja concentración (Oliveri *et al.*, 2008; Ponsone *et al.*, 2007). Aún no hay en bibliografía, datos acerca de la capacidad de producir OTA por parte de *A. uvarum*.

La ausencia de *A. carbonarius* como contaminante de uvas, parece ser una característica de la región. La mayoría de los trabajos realizados en Europa han detectado elevados niveles de contaminación con este hongo (Sage *et al.*, 2004; Bellí *et al.*, 2006; Pietri *et al.*, 2001; Serra *et al.*, 2006; Berente *et al.*, 2005), traducándose en vinos con elevadas concentraciones de OTA, mayores al límite permitido por la OIV. Sin embargo, en trabajos realizados en Argentina (Dalcero *et al.*, 2002; Magnoli *et al.*, 2003 y Ponsone *et al.*, 2007) no se han aislado cepas de *A. carbonarius* en el momento de cosecha. Por otro lado, Da Rocha Rosa *et al.* (2002), determinaron la presencia de *A. carbonarius* en Brasil, pero no en Argentina. Recientemente, Chiota *et al.* (2009) determinó que la presencia de *A. carbonarius* en Argentina, pero dicha presencia fue dependiente de la zona y la variedad. A su vez, se describe que las principales especies a la Sección *Nigri* aisladas de uva son especies del agregado *A. niger*, las especies monoseriadas *A. aculeatus* y *A. japonicus*.

Los resultados presentados en esta tesis, confirman que en referencia a la potencial contaminación de los vinos con OTA, la situación de nuestra región es marcadamente

diferente a la europea. Tanto en Argentina, sur de Brasil, y ahora en Uruguay, las especies contaminantes de uva fueron principalmente especies monoseriadas y pertenecientes al agregado *A. niger*, mientras que la ocurrencia de *A. carbonarius*, principal productor de ocratoxina en uva, es baja o nula. Esto hace suponer que la concentración de OTA presente en vinos de la región, en particular de Uruguay, será menor a la determinada en vinos europeos, lo cual aporta un valor adicional y se transforma en una característica fundamental de nuestros vinos.

Confirmación de la identidad por secuenciación

Veinticinco de las cepas aisladas e identificadas molecularmente fueron elegidas para confirmar su identidad mediante secuenciación de la región que codifica para la calmodulina. Once de las cepas elegidas fueron *A. uvarum*, siete fueron *A. niger*, 3 fueron *A. tubingensis* y 3 *A. foetidus*. Se incluyó también la cepa de colección CBS 111.26.

Con las secuencias obtenidas se realizó un árbol filogenético de similitud, el cual se muestra en la figura 28. El árbol filogenético se construyó utilizando el método de Neighbor-Joining, incluyendo el test bootstrap con 1000 réplicas. El porcentaje de réplicas en las cuales los datos quedaron asociados de determinada forma se muestra en los nodos donde divergen las diferentes ramas. Las distancias evolutivas se calcularon con el método de Jukes- Cantor y corresponden al número de sustituciones por sitio. El análisis filogenético mostrado se realizó mediante el programa Mega 4.

El agrupamiento obtenido en el árbol filogenético realizado fue concordante con la identificación realizada. Se constató una vez más, que ninguna de las cepas uruguayas correspondía a la especie *A. carbonarius* y que las cepas monoseriadas correspondían a la especie *A. uvarum*. Este es el primer reporte de *A. uvarum* como contaminante de uvas de la región.

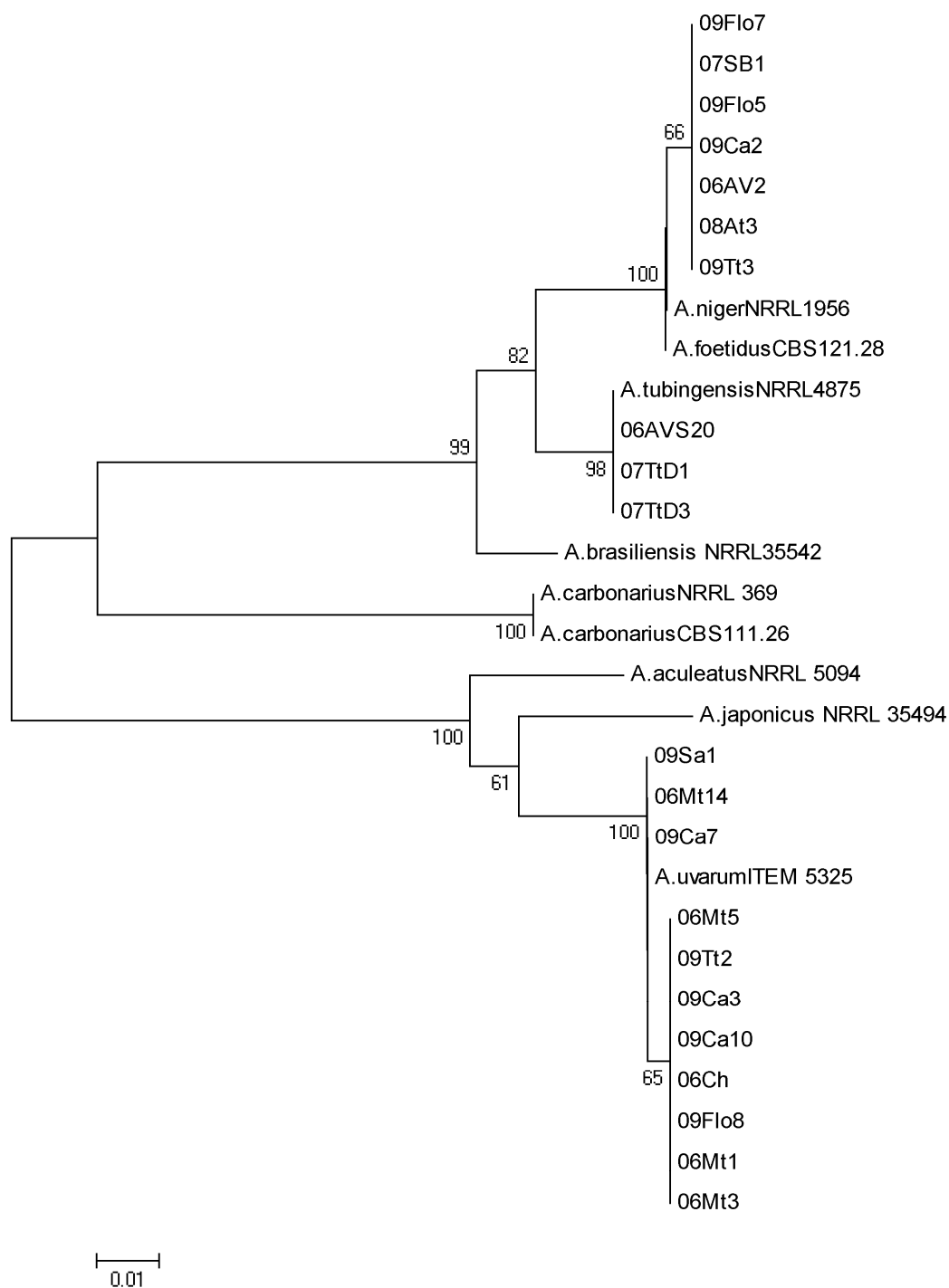


Figura 28. Arbol filogenético basado en secuencias de parte del gen de la calmodulina, para especies de la Sección *Nigri* del género *Aspergillus*

Caracterización de las cepas
pertenecientes a la Sección *Nigri* aisladas

Estudio de la capacidad de producir OTA en medio de cultivo

La producción de OTA en medio de cultivo CYA fue dependiente de la especie y de la cepa.

Solamente dos cepas de la especie *A. uvarum* fueron capaces de producir OTA en las condiciones ensayadas. La concentración obtenida en medio de cultivo para estas cepas fue de 1.5 y 4.1 ng de OTA/ g de medio de cultivo. En la figura 29 se muestra el cromatograma obtenido, luego de la extracción de la toxina del medio de cultivo para la cepa 09Ca4, identificada como *A. uvarum*.

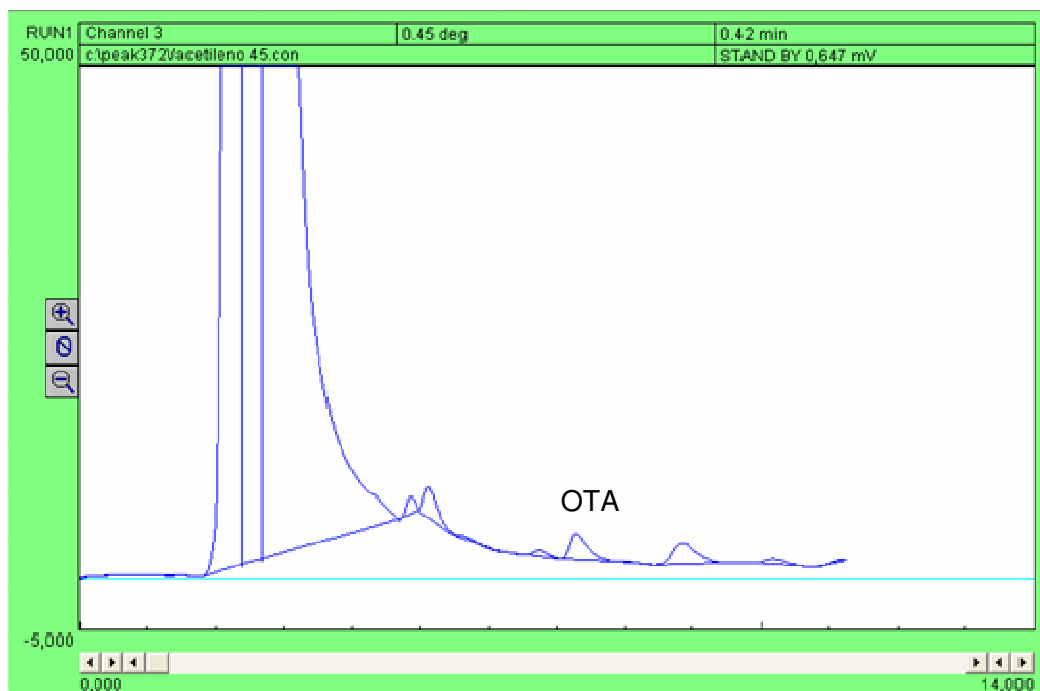


Figura 29. Producción de OTA de la cepa *A. uvarum* 09Ca4 en CYA.

Las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* produjeron OTA tanto en CYA como en YES agar. La producción en YES agar fue mucho mayor que en CYA, por lo se confirma lo expuesto por Esteban *et al.* (2006 b) con respecto a que el medio YES agar es más propicio para la producción de OTA por parte de las especies del agregado *A. niger*. Las concentraciones producidas en CYA dependieron de la cepa, y variaron entre 1.3 y 191 ng

OTA/ g medio. En medio YES agar, la producción varió entre 592 y 1166 ng OTA/ g medio, lo cual confirma la relevancia del sustrato en la producción de OTA, por parte de cepas

Las cepas identificadas como *A. tubingensis* fueron capaces de producir OTA en ambos medios de cultivos. De acuerdo a Martínez Culebras y Ramón (2007), estas cepas fueron clasificadas como *A. tubingensis* – like por ser *A. tubingensis* productoras de OTA.

La cepa de *A. carbonarius* NRRL 369 produjo, en las condiciones ensayadas, 15187 ng/g medio. En la figura 30, se muestra el cromatograma obtenido de la dilución 1/100, de la muestra obtenida luego de la extracción de la toxina del medio de cultivo CYA.

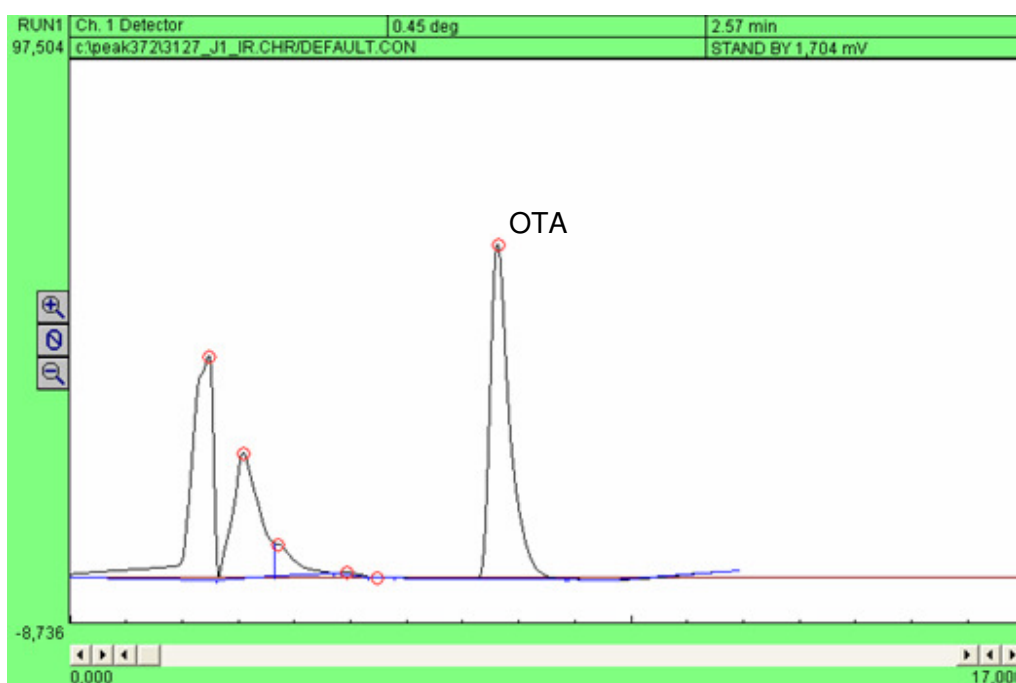


Figura 30. Producción de OTA de la cepa *A. carbonarius* NRRL369 en CYA.

Este resultado confirma que la especie de *A. carbonarius* presenta una capacidad de producción de OTA mucho mayor a la que presentan otras especies de la Sección *Nigri*.

La producción de cada cepa se presenta en el anexo 6.

Se confirmó la presencia de OTA por espectrometría de masa en tandem. El patrón de fragmentación del ión precursor de relación m/z 404 (Suloyk et al., 2007) coincidió con el

patrón de fragmentación del estándar, al mismo tiempo de retención. En las figuras 31 y 32 se muestran los cromatogramas y espectros obtenidos del estándar de OTA y de una muestra positiva confirmada respectivamente.

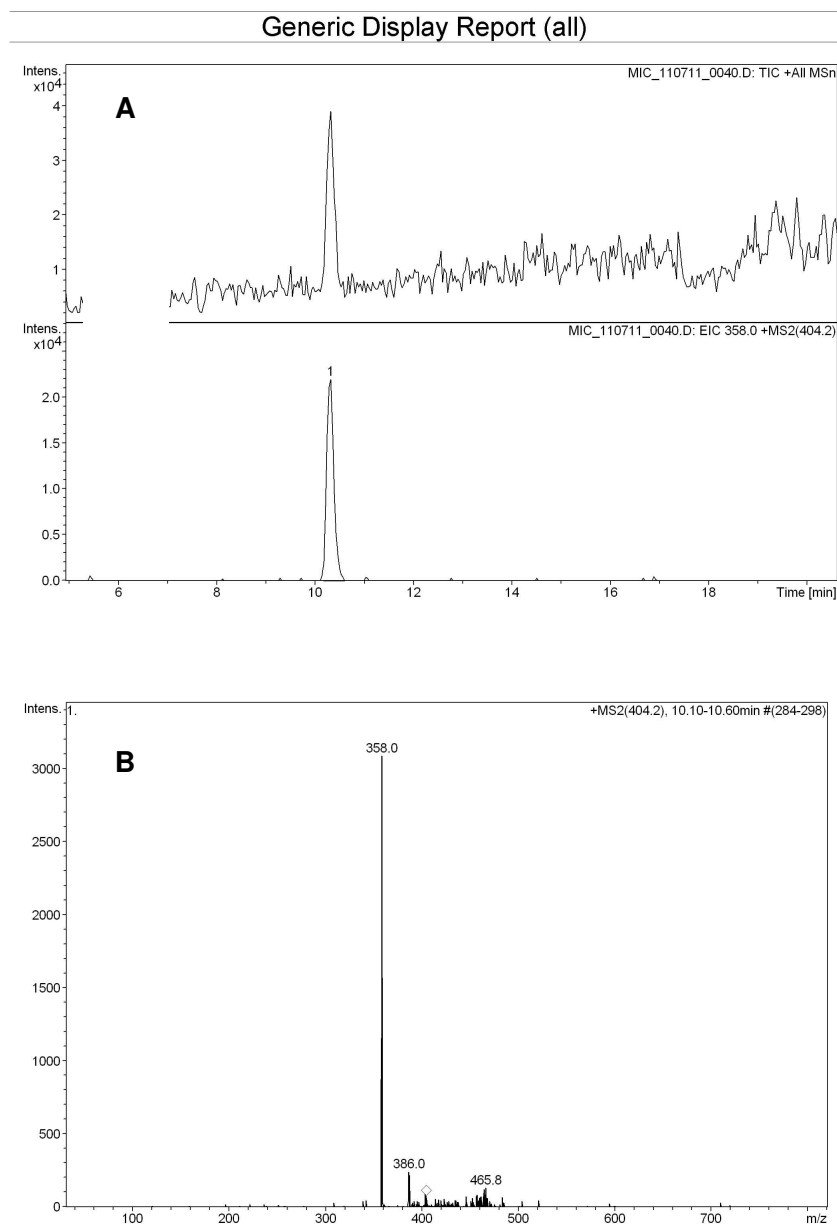


Figura 31. A. Cromatograma OTA. B. Espectro OTA.

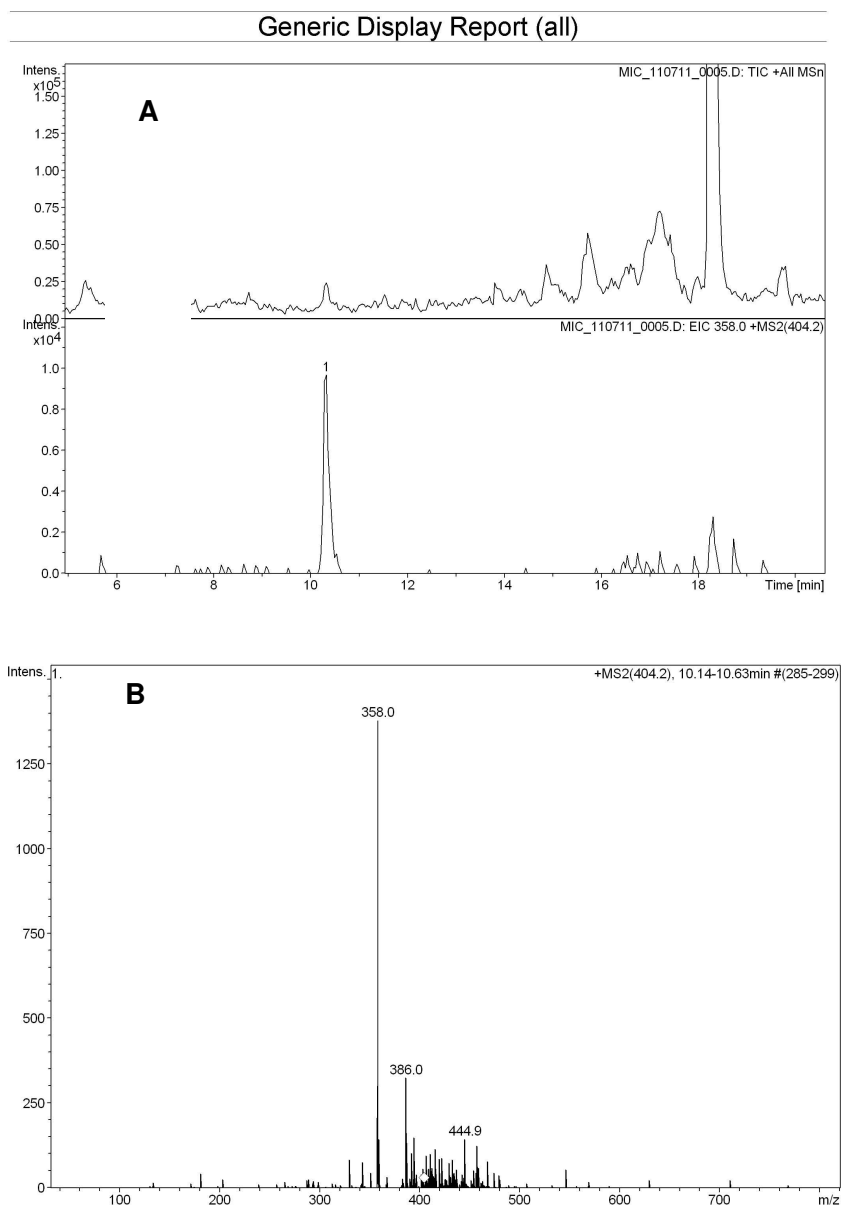


Figura 32. A. Cromatograma *A. uvarum* 06Mt1. **B.** Espectro OTA. *A. uvarum* Mt061

Estudio de la capacidad de producir OTA en uva Tannat

Se estudió la capacidad de cinco cepas de producir OTA en uva de la variedad Tannat. Las cinco cepas fueron capaces de producir OTA en las condiciones ensayadas. A partir de la concentración del extracto obtenido y de la masa de la uvas contaminadas, se determinó la

producción de OTA por gramo de uva. En la tabla 10 se la producción lograda por cada cepa y su identificación.

Cepa	Identificación	ng/g uva
06Mt1	<i>A. uvarum</i>	0.0078
06AVS20	<i>A. tubingensis- like</i>	0.0076
09Ca8	<i>A. niger</i>	0.0073
NRRL 369	<i>A. carbonarius</i>	0.49
09Ca2	<i>A. niger</i>	0.0069
06AV3	<i>A. foetidus</i>	0.0034

Tabla 10. Producción de OTA por gramo de uva

Tanto la cepa de *A. uvarum* como las pertenecientes al agregado *A. niger*, independientemente de su identidad, produjeron OTA en las uvas en concentraciones similares en las condiciones del ensayo. Si este resultado se extrapolara a la producción de vino y considerando un rendimiento del 75%, a partir de 10000 Kg de uva, se producirían 7500L de vino cuya concentración de ocratoxina A estaría en el entorno de 0.008 ppb, muy inferior al máximo permitido. A pesar de presentar capacidad de producir OTA en las condiciones ensayadas, su productividad es muy baja, por lo que su presencia no implica riesgo de presencia de OTA en vinos.

La cepa de *A. carbonarius* NRRL 369 produjo, en las condiciones ensayadas, aproximadamente 100 veces más que las cepas aisladas de uvas uruguayas. En la figura 33, se muestra el cromatograma obtenido, luego de la extracción de la toxina de las uvas para la cepa *A. carbonarius* NRRL 369.

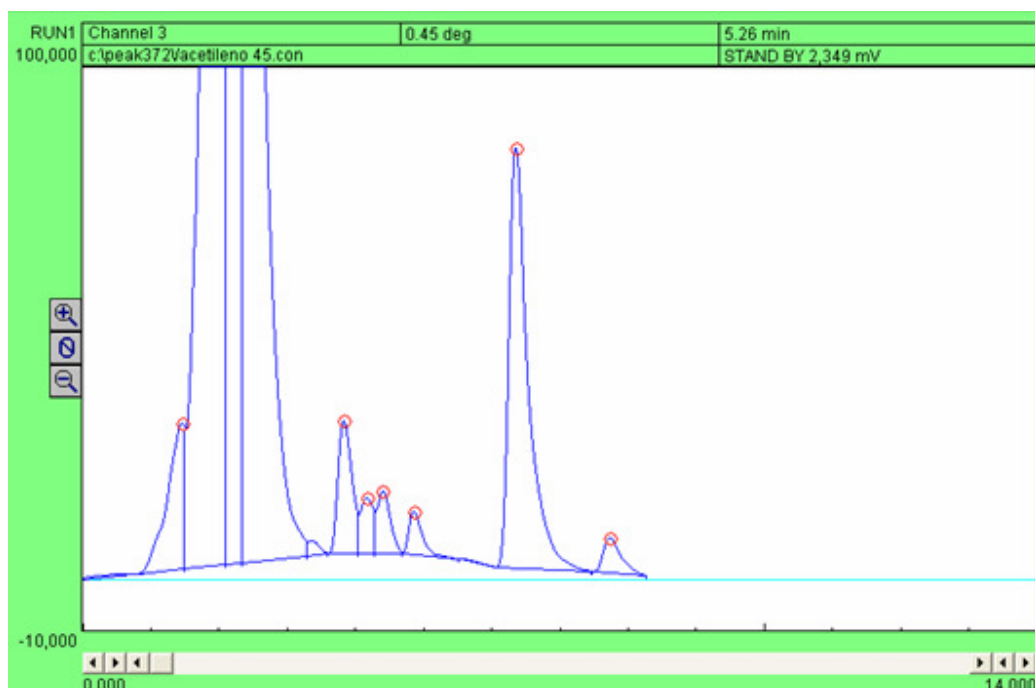


Figura 33. Producción de OTA de la cepa *A. carbonarius* NRRL369 en uva Tannat.

La extrapolación de este resultado, daría un vino con una concentración final de OTA de aproximadamente de 0.65 ppb. Si bien este valor es muy inferior al límite máximo permitido, queda evidenciado el mayor riesgo que implica la presencia de esta especie en uvas.

Existen muy pocos ejemplos de trabajos que demuestren la producción de OTA en uva. Díaz *et al.* (2009), ensayaron la capacidad de producir OTA en uvas de la variedad Cabernet Sauvignon de una cepas de *A. niger* y una de *A. carbonarius*. La producción alcanzó la concentración de 0.14 y 1 ppb respectivamente.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible la producción de OTA en uvas Tannat, tanto por *A. carbonarius* como por otras especies de la Sección *Nigri* del género *Aspergillus*. Este dato es importante porque hasta el momento, no se han registrado datos sobre contaminación de uva o vino Tannat con OTA. Este a su vez es el primer reporte sobre *Aspergillus uvarum* como productor de OTA, tanto en medio de cultivo como en uva. Por ello resultaba de suma importancia confirmar la identidad del metabolito estudiado, mediante

HPLC-MS. Los estudios realizados en el laboratorio de Análisis Químico, Polo tecnológico de Pando, confirmaron la presencia de OTA en las muestras positivas detectadas por HPLC con detector de fluorescencia.

Determinación *in vitro* de la sensibilidad a fungicidas de uso convencional

No hubo evidencia macroscópica de crecimiento cuando las cepas fueron enfrentadas al Pirimetanil, para todas las concentraciones ensayadas, por lo que se determinó que la concentración inhibitoria mínima fue menor 2 ppm.

Con respecto al iprodione, las cepas de *A. uvarum* presentaron, en su mayoría, una concentración inhibitoria mínima de 16 ppm. Cinco cepas presentaron una concentración inhibitoria mínima de 32 ppm, mientras que dos de ellas presentaron un CIM mayor a 32 ppm. Todas las cepas del agregado *A. niger*, independientemente de la especie, presentaron un CIM mayor a 32 ppm.

Con respecto al procymidone, dos cepas de *A. uvarum* presentaron la CIM en 32 ppm, una presentó un CIM de 256 ppm, mientras que para las restantes, la CIM fue de 128 ppm. El comportamiento de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* fue independiente de la especie, ya que todas las cepas presentaron una CIM mayor a 1028 ppm en las condiciones del ensayo. Estos resultados se resumen en la tabla 11. En el anexo 7 se presenta en detalle, el resultado obtenido para cada cepa.

Fungicida	<i>A. uvarum</i>	Agregado <i>A. niger</i>
Pirimetanil	< 2 ppm	< 2 ppm
Procymidone	32 – 64 ppm	>1028 ppm
Iprodione	8-32 ppm	> 32 ppm

Tabla 11. CIM de fungicidas de uso convencional

En las figuras 34 y 35 se observan las placas correspondientes a la determinación de la CIM de Iprodione para diez cepas de *A. uvarum* y diez cepas del agregado *A. niger* comparados con el control.

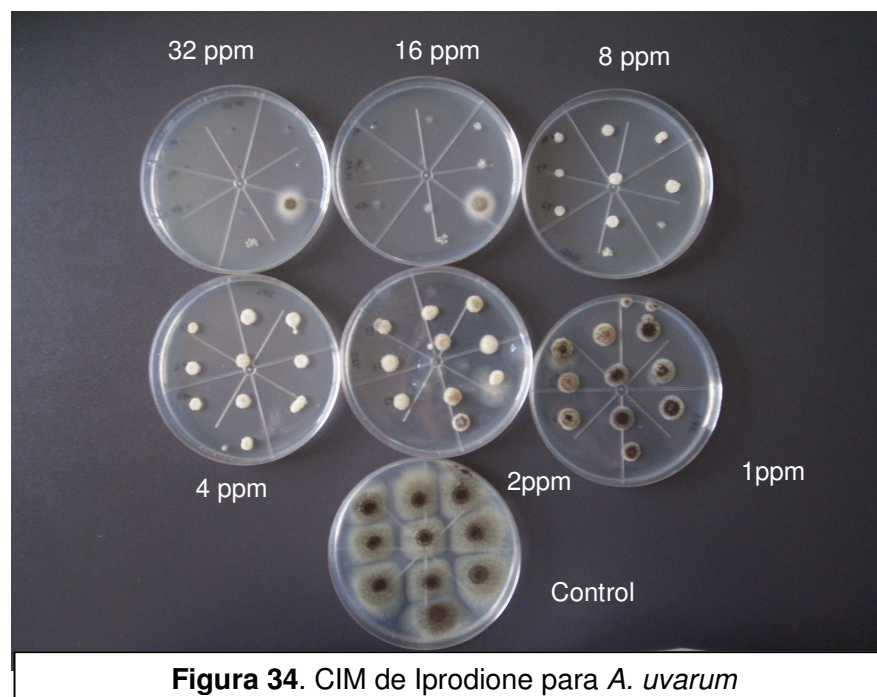


Figura 34. CIM de Iprodione para *A. uvarum*

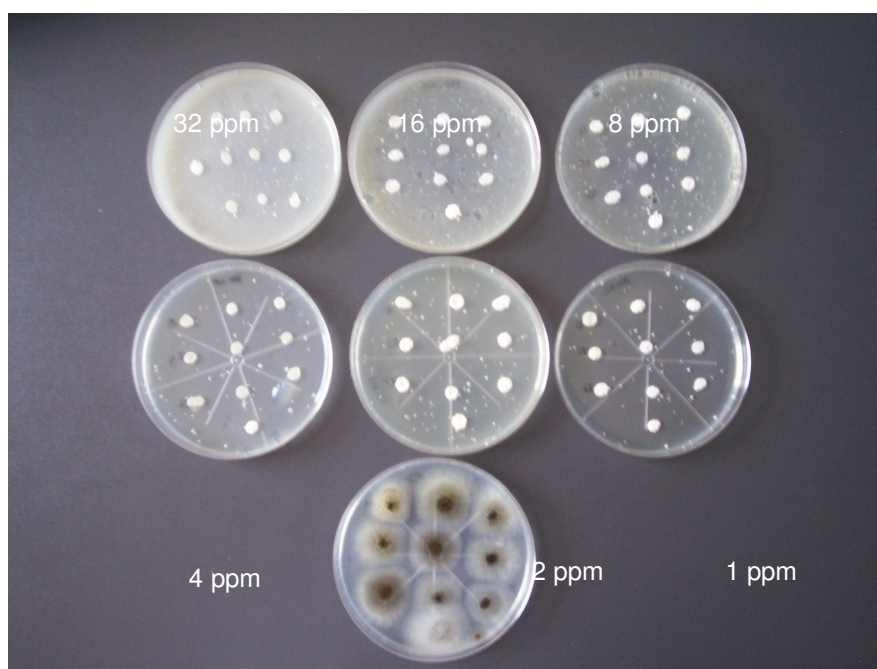


Figura 35. CIM de Iprodione para agregado *A. niger*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se podría decir que las cepas de *A. uvarum* son más susceptibles tanto al Iprodione como al Procymidone, en las condiciones del ensayo, que las cepas pertenecientes al agregado *A. niger*. En este caso habría una dependencia entre la sensibilidad a fungicida y la especie. Tanto las cepas de *A. uvarum* como las del agregado *A. niger* parecen ser más sensibles al Iprodione que al Procymidone.

Muy pocos son los trabajos disponibles en los que se estudia la sensibilidad de cepas de *Aspergillus*, pertenecientes a la Sección *Nigri* aisladas de uva a fungicidas de uso convencional para el control de *Botrytis*. Cabañes y Accensi (2004), determinaron que, *in vitro*, el Procymidone no fue activo frente *A. carbonarius* ni *A. niger*, mientras que el Ciprodinil, una anilinopirimidina al igual que el Pirimetanil, presentó actividad alta frente a *A. carbonarius* y moderada frente a *A. niger*.

En el trabajo de Gepp *et al.* (2011), se determinó la CIM *in vitro*, mediante el método utilizado previamente, para cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de diversos cultivos, entre los que se incluyó la vid. Con respecto comportamiento de las cepas frente al Iprodione, éstas se dividieron en dos grupos. Uno de cepas sensibles, cuya CIM fue menor a 2 ppm y otro grupo cuya CIM fue mayor a 8 ppm. Todas las cepas de *Aspergillus*, presentaron un comportamiento similar a las cepas menos sensibles de *Botrytis*.

Con respecto al Pirimetanil, Gepp *et al.* (2011), también agruparon las cepas de *Botrytis* en dos poblaciones teniendo en cuenta la sensibilidad al fungicida. Un grupo de cepas con sensibilidad menor a 1 ppm y otro, con sensibilidad mayor a 8 ppm. Todas las cepas de *Aspergillus*, presentaron un comportamiento similar al de las cepas más sensibles al pirimetanil.

El comportamiento de las cepas de *Aspergillus* frente a ambos fungicidas no se correlacionó con el comportamiento de *Botrytis*. En el caso de Iprodione, la sensibilidad de las cepas de *Aspergillus* fue similar a aquellas menos sensibles de *Botrytis*, mientras que en el caso de Pirimetanil, el comportamiento de las cepas de *Aspergillus* fue similar al de aquellas más sensibles.

La sensibilidad de un aislamiento a un fungicida en condiciones *in vitro*, no es

extrapolable a la aplicación en condiciones de campo. Sin embargo, los datos aportados por los ensayos de sensibilidad a fungicidas *in vitro*, permitirán determinar perfiles de sensibilidad y su evolución en el tiempo.

Cuantificación de *Aspergillus carbonarius* por PCR en tiempo real

Puesta a punto de PCR en tiempo real para la cuantificación de *A. carbonarius*

Especificidad de los primers

Se comprobó la especificidad de los *primers* tanto en la PCR convencional como en la PCR en tiempo real. En el primer caso, se observó amplificación de un fragmento de 66 pb, sólo en el caso de *A. carbonarius*, mientras que en PCR en tiempo real, el Ct obtenido para las especies *A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis* –like y *A. uvarum* fue muy cercano al correspondiente al blanco. En la Figura 36 se observa la curva obtenida para dos concentraciones de *A. carbonarius* (0.27 ng -a-, y 0.0027ng -b-), las curvas obtenidas para las concentraciones del mismo orden de *A. niger* y *A. uvarum* y dos repeticiones del blanco (conjunto c).

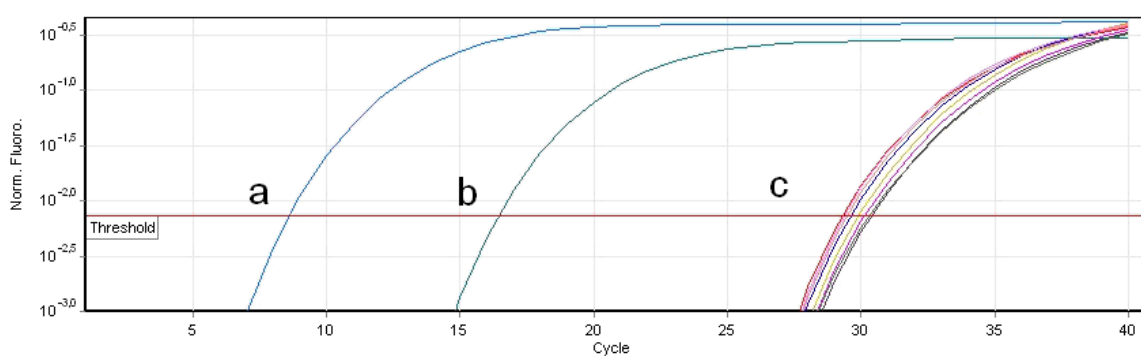


Figura 36. PCR en tiempo real para *A. carbonarius* (a y b), *A. uvarum* y *A. niger* (c)

En la Tabla 12 se detallan varias concentraciones de *A. niger*, *A. uvarum*, *A. foetidus* y *A. tubingensis-like* y los correspondientes Ct obtenidos, comparados con el blanco.

ng ADN	Ct <i>A. niger</i>	Ct <i>A. uvarum</i>	Ct <i>A. foetidus</i>	Ct <i>A. tubingensis-like</i>
0.12	27.1 ± 2.3	31.8 ± 3.7	29.1 ± 2.2	29.1 ± 1.5
0.012	30.8 ± 0.4	32.2 ± 3.7	29.4 ± 0.5	29.25 ± 2.0
0.0012	31.1 ± 2.71	32.3 ± 3.7	29.1 ± 0.1	29.6 ± 0.1
1.2X10 ⁻⁴	33.4 ± 2.8	28.7 ± 1.3	29.3 ± 0.3	29.9 ± 0.2
blanco	29.5 ± 0.9	29.5 ± 0.9	29.0 ± 0.5	29.0 ± 0.5

Tabla 12. Comparación entre Ct *A. niger*, Ct *A. uvarum*, Ct *A. foetidus* y Ct *A. tubingensis-like*.

Curva estándar

La curva estándar obtenida para la cuantificación de *A. carbonarius*, la cual se muestra en la Figura 30, presentó una linealidad ($r^2 = 0.997$) y eficiencia (107 %) dentro de lo esperado. El rango dinámico se definió entre 0.27ng y 2.7×10^{-5} ng ya que para cantidades de ADN superiores o inferiores la curva de calibración perdió linealidad. Las barras error de la Figura 37 representan los intervalos de confianza de cada punto. En todos los casos el error no superó el 1.3 % del valor.

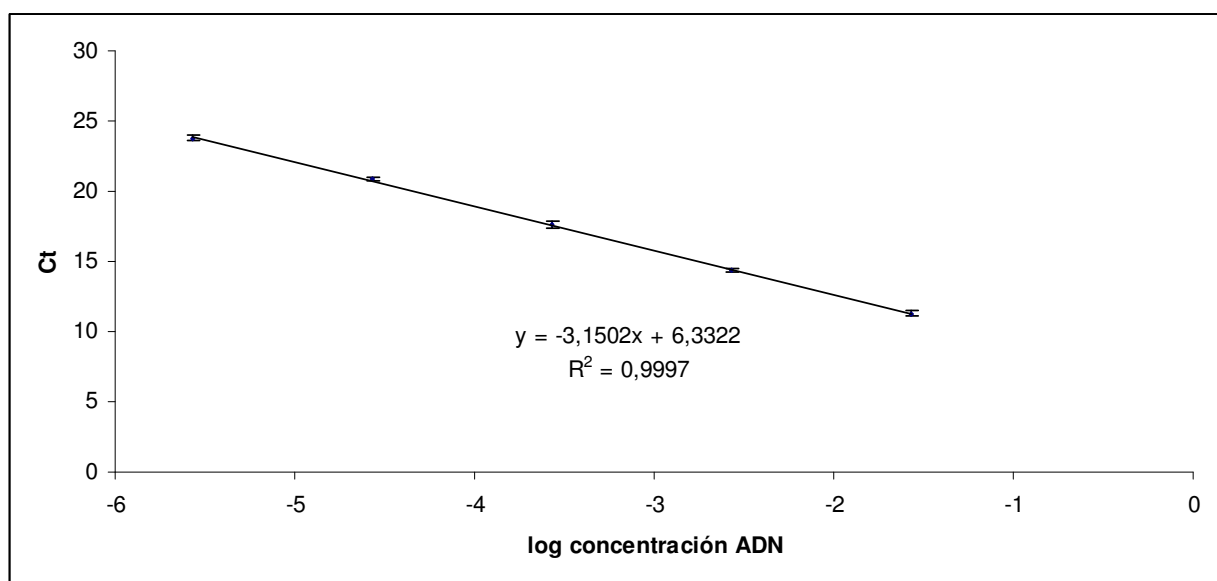


Figura 37. Curva estándar de cuantificación de *A. carbonarius*

Influencia de la matriz la PCR en tiempo real.

La Tabla 12 muestra los resultados del análisis de la influencia de la matriz en el método. No se observó inhibición por la matriz en estudio en las condiciones del ensayo ya que el Ct obtenido en presencia de extracto de uva fue similar al Ct obtenido en presencia de agua, encontrándose las diferencias de Ct dentro del error del método.

ng ADN	Ct uva	Ct agua
0.27	11.5 ± 0.2	10.9 ± 0.8
0.0027	17.6 ± 0.9	17.6 ± 0.1

Tabla 13. Influencia de la matriz en la PCR en tiempo real

El método puesto a punto fue específico para *A. carbonarius*. La fluorescencia generada con las especies *A. niger* y *A. uvarum*, principales contaminantes de uvas uruguayas, así como para *A. foetidus* y *A. tubingensis*- like, detectadas en forma minoritaria en uvas, para todas las concentraciones ensayadas no mostró diferencias significativas con respecto al blanco. Se postula que la fluorescencia generada a estos valores de Ct podría deberse a hibridación de primers. Este resultado es muy importante ya que asegura que en uva no habrá cuantificación inespecífica en ausencia de *A. carbonarius*.

Con respecto a la eficiencia, para un método de PCR en tiempo real, se espera que la misma esté entre 90 y 110 % (Rebrikov y Trofimov, 2006). En el caso de este trabajo la eficiencia se encontró dentro de este rango, por lo cual se puede inferir que la amplificación ha funcionado correctamente, sin interferencias. Con respecto al rango dinámico, el límite inferior del método fue de 2.7×10^{-5} ng de ADN de hongo. De acuerdo a Selma *et al.* (2008), una conidia de *A. carbonarius* contiene 3.15×10^{-5} ng de ADN, por lo que se podría decir que el límite mínimo de detección del método es menor a una conidia por reacción.

Por último, este método no presenta inhibición por la matriz, la fluorescencia generada en presencia de extracto de uva de la variedad Tannat es la misma que en presencia de agua, por lo que es un método que podría ser aplicable para la cuantificación de *A. carbonarius* en uvas Tannat naturalmente contaminadas. El uso de este método permitiría predecir el riesgo de contaminación con OTA del vino elaborado a partir de la uva analizada, lo cual ayudaría a la bodega a tomar medidas preventivas a la hora de la elaboración.

CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

El muestreo realizado permitió detectar, sobre uva de diferentes variedades, la presencia de cepas *Aspergillus* pertenecientes a la Sección *Nigri*, las cuales fueron identificadas como pertenecientes al agregado *A. niger* y como *A. uvarum*. Sin embargo, no se detectaron cepas de *Aspergillus carbonarius*, principal causante de la presencia de OTA en vinos debido a su capacidad de producir altas concentraciones de la toxina en uva.

Si bien todas las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* y algunas identificadas como *A. uvarum* fueron capaces de producir OTA, tanto en condiciones de laboratorio como en uva, su capacidad de producir OTA resultó mucho menor a la evidenciada por una cepa de colección de la especie *A. carbonarius*. Estos hallazgos hacen suponer que si bien existe un eventual riesgo de presencia de OTA en uvas, es de esperar que los niveles de contaminación en el vino, sean bajos. Esto otorga a los vinos uruguayos un valor agregado muy importante en términos de seguridad alimentaria que debería ser promovido al momento de la oferta en mercados europeos.

Como resultado de esta tesis se dispone de un conjunto de métodos accesibles para el monitoreo de hongos productores de OTA en uva, Sería importante extender el estudio realizado a otras zonas de producción del país y a otras variedades de uva, de forma de determinar si existen diferencias geográficas o varietales en cuanto al riesgo de producción de vinos contaminados con OTA.

Debido al riesgo potencial que implica la aparición de *A. carbonarius* en uva, su presencia debería ser monitoreada de forma regular. Un método factible de ser utilizado para tal fin podría ser la PCR en tiempo real, debido a que resulta un método rápido, sencillo de utilizar para un operador entrenado, y cuyo límite de detección es menor al que presentan los métodos convencionales.

Los resultados de esta tesis constituyen una primera aproximación al problema. Los resultados para la producción nacional son alentadores. Sin embargo el estudio de la problemática debería continuar con el fin de establecer medidas correctivas en el caso de una eventual contaminación

BIBLIOGRAFÍA

Abarca, M.L.; Accensi, F.; Cano, J.; Cabañes, F.J. 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86:33-49.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Ch. 49 Natural Toxins; supchapter 5; 970.43B

Battilani, P.; Magan, N.; Logrieco, A. 2006. European research on ochratoxin A in grapes and wine. 111(1): S2-S4.

Bau, M.; Castellá, G.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. 2006. RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate from grapes from Europe and Israel. *International Journal of Food Microbiology*. 111: S18-S21.

Bau, M.; Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Minguéz, S.; Cabañes, F.J. 2004. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 98(2):125-130.

Bejaoui, H.; Mathieu, F.; Taillandier, P.; Lebrihi, A. 2004. Ochratoxina A removal in synthetic and natural grape juice by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 97:1038-1044.

Bellí, N.; Bau, M.; Marín, S.; Abarca, M.L.; Ramos, A.J.; Bragulat, M.R. 2006. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 111(1):S40-S45

Bellí, N.; Ramos, A.J.; Coronas, I.; Sanchís, V.; Marín, S. 2005. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 839 – 844.

Bellí, N.; Ramos, A.J.; Sanchís, V.; Marín, S. 2004a. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*. 38: 72 – 77.

Bellí, N.; Marín, S.; Sanchís, V.; Ramos, A.J. 2004b. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 96: 19 – 27.

Berente, B.; Moricz, A.; Otta, K.; Zaray, G.; Leko, L.; Racz, L. 2005. Determination of ochratoxin A in Hungarian wines. *Microchemical Journal*. 79: 103-107.

Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Cabañes, F.J. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin S in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 139-144.

Cabañas, R.; Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. 2009. *In vitro* activity of imazalil against *Penicillium expansum*: Comparison of the CLSI M38-A broth microdilution method with traditional techniques. *International Journal of Food Microbiology*. 129 (1): 26 - 29.

Cabañes, F.X.; Accensi, F. 2004. Influencia de la lucha fitosanitaria en el viñedo sobre la presencia de oratoxina A en el vino. Informe Técnico. INCAVI, Syngenta AGRO S.A., Dept. Sanitat i Anatomia Animals, Microbiología, UAB y Laboratorio Arbitral Agroalimentario, MAPA.

Cecchini, F.; Morassut, M.; Garcia Moruno, E.; Di Stefano, R. 2005. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentaion of white and red must. *Food Microbiology*. 23 (5): 411 – 417.

Costa Alves, M.A. 2002. Prevention of fungal contamination (ochratoxin A) in Port Wine and Vino Verde.

Crespo-Sempere, A.; González-Cadenas, L.; Martinez-Culebras, P.V. 2010. Genes differentially expressed by *Aspergillus carbonarius* strains under ochratoxin A producing conditions. *International Journal of Food Microbiology* 142 (2010) 170–179

Cui, W., Beever, R.E.; Parkes, S.L.; Weeds, P.L.; Templeton, M.D. 2002 An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology*. 36:187–198.

Chiotta, M.L.; Ponsone, M.L.; Combina, M.; Torres, A.M.; Chulze, S. 2009. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 136: 137-141.

Chulze, S.N.; Magnoli, C.E.; Dalcero, A.M. 2006. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology*. 111(1): S5-S9

Da Rocha Rosa, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fragay, M.E., De Oliveira, A., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M. 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 19(4): 408-414.

Dall'Asta, C.; De Dea Lindner, J.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Neviani, E.; Marchelli, R. 2008. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chemistry*. 106 (2): 729-734.

Dalcero, A.; Magnoli, C.; Hallak, C.; Chiacchiera, S.M.; Palacio, G.; Rosa, C.A.R. 2002 . Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 19: 1065–1072.

Díaz, G., Torres, R., Vega, M., Latorre, B. 2009. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards threshold levels on grapes. *Internacional Journal of Food Microbiology* 133, 195-199.

Dirheimer, G.; Creppy, E. 1991. Mechanism of action of ochratoxin A. *IARC Scientific Publication*. 115: 171-186.

El Khoury, A.; Atoui, A. 2010. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*. 2: 461-493.

Esteban, A.; Abarca, M.L. Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. 2006a. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology*. 23:634-640.

Esteban, A.; Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. 2006b. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *International Journal of Food Microbiology*. 108:188-195.

Esteban, A.; Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. 2006c. Effect of pH on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. Food Additives and Contaminants.

Esteban, A.; Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. 2005. Influence of pH and incubation time on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in cultura media. Journal of Food Protection. 68 (7): 1435 – 1440.

Esteban, A.; Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. 2004. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black Aspergilli. Research in Microbiology. 155: 861 – 866.

Fennema, O.R. 1985. Food Chemistry. 2^{da} Edición. New York: Marcell Dekker, Inc.

Gallo, A.; Perrone, G.; Solfrizzo, M.; Epifani, F.; Abbas, A.; Dobson, A.; Mulè, G. 2009. Characterization of a pks gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*.

García, D.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; Marín, S. 2010. Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions and inoculum size. Food Microbiology 27 : 909 – 917.

Gepp, V.; Vero, S.; Cassanello, M.; Romero, G.; Elisa, S.; González, P.; Rebellato, J.; Ferreira, Y.; Bentancur, O. 2011. Resistencia a fungicidas de *Botrytis cinerea* en el Uruguay. Agrociencia. XV (2). (En prensa).

Glass, N.L.; Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology. 61 (4): 1323-1330.

González Salgado, A. 2010. Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2010. (Tesis Doctoral)

González Salgado, A.; Patiño, B.; Gil-Serna, B.; Vazquez, C.; Gonzalez Jaén, M.T. 2009. Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBr green and TaqMan quantitative PCR

assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. FEMS Microbiological Letters. 295 : 57-66

Griffiths, R.; Whiteley, A.; O'Donnell, A.; Bailey, M. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. Applied Environmental Microbiology. 66 : 5488–5491.

Higgins, D.G. 1994. CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. Methods in Molecular Biology. 25 : 307 – 318.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1993. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. 56:489-521.

Jackson, L.S.; Al-Taher, F.D. 2008. Factors affecting mycotoxin production. Mycotoxins in fruits and vegetables. 75-104.

Juan, C.; Moltó, J.C.; Lino, C.M.; Mañes, J. 2008. Determination of ochratoxin A in organic and non organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. Food Chemistry. 107 (1): 525-530.

Jukes, T.H.; Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. En Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.

Kokkonen, M.; Jestoi, M.; Rizzo, A. 2005. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. International Journal of Food Microbiology. 99(2): 207-214.

Kurtzman, C.P.; Droby, S. 2001. *Metschnikowia fruticola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest rots. Systematic and Applied Microbiology. 24 (3): 395 – 399.

Leong, S.L.; Hocking, A.D.; Pitt, J.I.; Kazi, B.A.; Emmett, E.S.; Scott, E.S. 2006a. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. International Journal of Food Microbiology. 111: S10-S17.

Leong, S.L.; Hocking, A.D.; Pitt, J.I.; Kazi, B.A.; Emmett, R.W.; Scott, E.S. 2006b. Black *Aspergillus* spp. in Australian vineyards: from soil to ochratoxin in wine. In Hocking, A.A.; Pitt, J.I.; Samson, R.A.; Thrane, U. (Eds.), *Advances in Food Mycology*. Springer, New York. 153-171.

López, C.E.; Ramos, L.L.; Ramadán, S.S.; Bulacio, L.C. 2003. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control*. 14: 31 – 34.

López de Cerain, A.; Jiménez, A.M.; Ezpeleta, O.; Bello, J. 2000. Efectos tóxicos de la ocratoxina A. *Revista de Toxicología*. 17, 61-69. (2000).

Magnani, M.; Fernandes, T.; Cavenaghi Prete, C.E.; Homechim, M.; Sataque Ono, E.Y.; Vilas-Boas, L.A.; Sartori, D.; Furlaneto, M.C.; Pelegrinelli Fungaro, M.H. 2005. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola*. 62(1): 45 - 49.

Magnoli C., Astoreca A., Ponsone L., Combina M., Palacio G., Da Rocha Rosa C., Dalcero A.M. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. 2004 *Letters in Applied Microbiology*. 39(4): 326 - 331.

Martínez-Culebras, P.V.; Ramón, D. 2007. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 113(2):147-153

Mateo, R.; Medina, A.; Mateo, E.M.; Mateo, F.; Jiménez, M. 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 119 (1-2): 79 - 83.

Mattila, T.Y.; Mach, R.L.; Alekhina, I.A.; Koskinen, S.; Kulling, C.M.; Kubicek, C.; Klemsdal, S. 2004. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, β -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 95 (3): 267 – 385.

Medina, A.; Mateo, E.M.; Valle-Algarra, F.M.; Mateo, F.; Mateo, R.; Jiménez, M. 2008. Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic

strains of *Aspergillus* spp. isolated from grapes. International Journal of Food Microbiology. 12 (1): 93 – 99.

Mitchell, J.I.; Zuccaro, A. 2006. Sequences, the environment and fungi. Mycologist. 20: 62-74.

Mitchell, D.; Parra, R.; Aldred, D.; Magan, N. 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. Journal of Applied Microbiology. 97: 439 – 445.

Montagna, M.T.; Napoli, C.; De Gilgio, O.; Iatta, R.; Barbuti, G. 2008. Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in southern Italy. International Journal of Molecular Science. 9 (12): 2614 – 2621.

O'Brien, M.; Egan, D.; O'kiely, P.; Forristal, P.; Doohan, F.; Fuller, H. 2008. Morphological and molecular characterisation of *P. roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. Mycological Research. 112 (8): 921 – 932.

Ochiai, N.; Fujimura, M.; Motoyama, T.; Ichiishi, A.; Usami, R.; Horikoshi, K.; Reimann, S.; Deising, H.B. 2005. Inhibition of efflux Transporter-Mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-Hydroxyflavone and enhancement of Fungicide activity. Applied Environmental Microbiology. 71: 3269 - 3275.

Olive, D.M.; Bean, B. 1999. Principles and Applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. Journal of Clinical Microbiology. 37 (6): 1661-1669.

Oliveri, C., Torta, L., Catara, V. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. 2008. International Journal of Food Microbiology, 127 (1-2): 147-154.

Ostenfeld, L.; Svendsen, A.; Smedsgaard, J. 2001. Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. Applied and Environmental Microbiology. 67(8):3630-3635

- Ottender, H.; Majerus, P. 2000. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food additives and contaminants*. 17(9): 793-798.
- Pattono, D.; Gallo, P.F.; Civera, T. 2011. Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chemistry*. 127: 374 - 377
- Pelegri, J.M.; Velásquez, C.; Sanchos, V.; Canela, R. 1997. Solid phase extraction on sax columns as an alternative for ochratoxin A analysis in maize. *Revista Iberoamericana de Micología*. 14:194-169.
- Pietri, A.; Bertuzzi, T.; Pallaroni, L.; Piva, G. 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and contaminants*. 18 (7): 647-654.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edition. Gaithersburg, Maryland.
- Ponsone, M.L.; Combina, M.; DAlcero, A.; Chulze, S. 2007. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non organic systems. *International Journal of Food Microbiology*. 114: 131-135.
- Rebrikov, D.V.; Trofimov, D. 2006. Real time PCR: A review of approaches to data analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42 (5): 455-463.
- Rousseau, J. 2004. Ochratoxina A en los vinos: estado de los conocimientos. Los medios de prevención en el viñedo. *Wine Internet Technical Journal*.
- Sáez, J.M.; Medina, A.; Gimeno-Adelantado, J.V.; Mateo, R.; Jiménez, M. 2004. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1029:125-133.
- Sage, L.; Garon, D.; Seigle-Murandi, F. 2004. Fungal Microflora and Ochratoxin A Risk in French Vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 5764-5768.
- Saitou, N.; Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*. 4:406–425

Santos Chona, O.M. 1999. Importancia y efectos de la aflatoxina en seres humanos. MedUNAB. 2 (6): 124 – 129.

Sambrook, Fritsch, Magnatis, . 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2º ed.

Samson, R.A.; Noonim, P.; Meijer, M.; Houbroken, J.; Frisvad, J.C.; Varga, J. 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. Studies in Mycology 59: 129–145.

Samson, R.A.; Houbroken, J.; Kuijpers, A.; Frank, J.M., Frisvad, J.C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. Studies in Mycology. 50:45-61.

Selma, M.; Martínez-Culebras, P.V.; Aznar, R.; 2008. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. International Journal of Food Microbiology. 122: 126-134.

Serra, R.; Peterson, S. 2008. Multilocus sequence identification of *Penicillium* species in cork bark during plank preparation for the manufacture of stoppers. Research in Microbiology..159 178- 186.

Serra, R.; Mendoça, C.; Venâncio, ,A. 2006a. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. Letters in Applied Microbiology. 42:42-47.

Serra, R.; Menconça, C.; Venâncio, A. 2006b. Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. International Journal of Food Microbiology. 111: S35-S39.

Serra, R.; Bonvehí, J.; 2004. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 52(20): 6347-6352.

Serra, R.; Abrunhosa, L.; Kozakiewicz, Z.; Venâncio, A. 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. International Journal of Food Microbiology. 88(1):63-68.

Schilter, B.; Marin-Kuan, M.; Delatour, T.; Nestler, S.; Mantle, P.; Cavin, C. 2005. Ochratoxin A: Potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity. *Food Additives and Contaminants*. 1: 88–93

Sierotzki, H.; Edel, D. 2006. Fungicide Resistance Action Committee

Silvério, A.; Lopes, M.M.; de Freitas, G. 2010. Determination of Fungal Contamination, Aflatoxin B1 and Ochratoxin A Content in Peanuts Available in Portuguese Market. *Journal of Biotechnology*. 150 (1): 305.

Stevens, F.J. 1983. Calmodulin: an introduction. *Biochemistry and Cell Biology*. 61(8): 906–910

Suloyk, M.; Kraska, R.; Schuhmacher, R. 2007. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389: 1505 – 1523.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mega 4 software* 1596 – 1599.

Tassou, C.C.; Panagou, E.Z.; Natskoulis, P.; Magan, N. 2007. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes. *Journal of Applied Microbiology*. 103 (6) : 2267-76.

Teixeira de Magalhães, J.; Andrade Sodr , G.; Viscogliosi, H.; Grenier-Loustalot, M.F. 2011. Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans. *Food Control*. 22 (5): 744-748.

Ter n, J.; Varga, J.; Hamari, Z.; Rinyu, E.; Kevei, F. 1996. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathology*. 134: 171 – 176.

Tessini, C.; Mardones, C.; Von Baer, D.; Vega, M. ; Herlitz, E. ; Saelzer, R.; Silva, J.; Torres, O. 2010. Alternatives for sample pre-treatment and HPLC determination of ochratoxin A in red wine using fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 660 : 119-126

Torelli, E.; Firrao, G.; Locci, R.; Gobbi, E. 2006. Ochratoxin A producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes used for the production of “passito” wines. *International Journal of Food Microbiology*. 106: 307-312.

Vatinno, R.; Aresta, A.; Zambonin, C.G.; Palmisano, F. 2008. Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1187 (1): 145-150.

Vikgalys, M. 1998. Genetic relatedness among anastomosis group in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology*, 78:698.

Visconti, A.; Pascale, M.; Centoze, G. 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean up and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 864 : 89–101.

Yamaguchi, J.; Fujimura, M. 2005. Recent topics on action mechanisms of fungicides. *Journal of Pesticide Science*. 30 : 67-74.

ANEXOS

Anexo 1

Buffer CTAB

- Pesar:

- 20 g de CTAB
- 82g NaCl
- 15.75g Tris-HCl
- 7.5g Na₂EDTA

- Agregar 500mL de agua destilada.

- Ajustar pH a 8.0 con NaOH

- Completar el volumen hasta 1L.

- Autoclavar

- Almacenar a 4°C.

CTAB solución de precipitación

- Pesar:

- 1g CTAB
- 0.5g NaCl

- Agregar 100 mL de agua destilada

- Ajustar pH a 8.0 con NaOH 1M

- Completar el volumen hasta 200mL

- Almacenar a 4°C

NaCl 1.2M

- Disolver 7g de NaCl en 100mL de agua destilada

- Autoclavar
- Almacenar a temperatura ambiente

NaOH 1M

- Disolver 2g de NaOH en 50mL de agua destilada.
- Almacenar a temperatura ambiente

ARNasa

- Disolver la ARNasa hasta una concentración final de 10mg/mL en agua destilada
- Calentar la solución hasta 95°, 15 minutos.
- Alicuotar
- Almacenar a -20°C

Proteinasa K

- Disolver proteinasa K hasta una concentración final de 20mg/mL en agua destilada.
- Alicuotar
- Almacenar a -20°C

Anexo 2



CERTIFICATE OF ANALYSIS

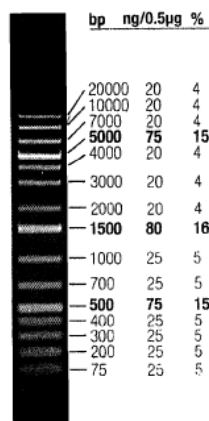
**GeneRuler™
1kb DNA Ladder Plus**

#SM1331 250(5x50)µg
(for 500 applications)
Lot: 00013535
Concentration: 0.5µg/µl
Supplied with: 2x1 ml 6X Loading Dye Solution

Store at -20°C.



GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus



1% TopVision™ LE GQ Agarose (#R0491).
0.5µg/lane, 8cm length gel, 1X TAE, 7V/cm, 45min

Formation of diffused bands of small DNA fragments is a feature of agarose gel electrophoresis.



CERTIFICATE OF ANALYSIS

**GeneRuler™
100bp Plus DNA Ladder**

Re-order #: SM0321, SM0322

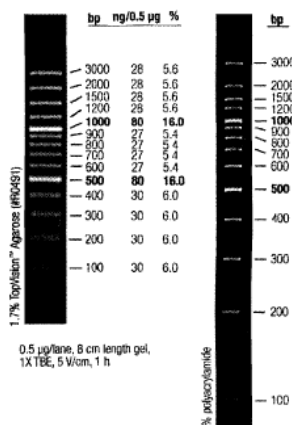
#SM0329 10 µg (for 20 applications)
Lot: 00067286
Concentration: 0.5 µg/µl
Supplied with: 0.1ml 6X Loading Dye Solution

Store at -20°C



In total 2 vials.

GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TBE, 5 V/cm, 1 h

0.5 µg/lane, 20 cm length gel,
1X TBE, 8 V/cm, 3 h

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

This product or its use is covered by at least one claim of U.S. Patent Nos. 5,834,201, 6,680,376, and/or 7,132,520 owned by Invitrogen Corporation. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product in internal research conducted by the buyer. The buyer cannot use this product or materials made by the employment of this product for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product in manufacturing; (2) use of the product to provide a service, information, or data; (3) use of the product for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product, whether or not the product is resold for use in research. Further information on purchasing licenses under the above patents may be obtained by contacting the Business Development Department, Invitrogen Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Email: outlicensing@invitrogen.com.

ISO 9001:2008
www.fermentas.com



CERTIFICATE OF ANALYSIS

GeneRuler™

50bp DNA Ladder,
ready-to-use

Re-order #: SM0373

#SM0378 10 µg (for 20 applications)

Lot: 00070178

Concentration: 0.1 µg/µl

Supplied with: 0.1 ml 6X DNA Loading Dye

Store: at room temperature or at 4°C for periods
up to 6 months. For longer periods store at -20°C.

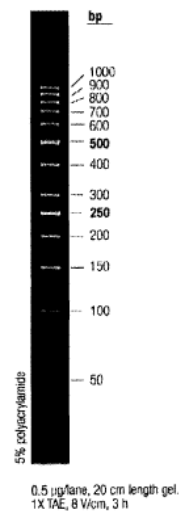
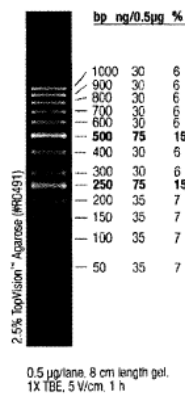


13037800070178000018

In total 2 vials.



ISO 9001:2015
www.fermentas.com



Anexo 3

Czapek Yeast Agar(CYA)

- Pesar

- 1g K_2HPO_4
- 5g Extracto de levadura
- 30g Sacarosa
- 15g Agar

- Agregar

- 1mL solución traza de metales
- 10mL solución Czapek

- Completar el volumen hasta 1 L con agua destilada

- Autoclavar

Solución traza de metales

- Pesar

- 0,5g $CuSO_4 \cdot 7H_2O$
- 1g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

- Agregar 100 mL de agua destilada

- No autoclavar

Solución Czapek

- Pesar

- 30g $NaNO_3$
- 5g KCl
- 5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0,1g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

- Agregar 100 mL de agua destilada

- No autoclavar

Yeast Sucrose agar (YES agar)

- Pesar
 - 20g Extracto de levadura
 - 150g Sacarosa
 - 15g Agar
- Agregar 1L de agua destilada
- Autoclavar

Anexo 4

Cepa	Año	Variedad	Lugar
06Mt1	2006	Merlot	Canelones
06Mt2	2006	Merlot	Canelones
06Mt3	2006	Merlot	Canelones
06Mt4	2006	Merlot	Canelones
06Mt5	2006	Merlot	Canelones
06Mt8	2006	Merlot	Canelones
06Mt9	2006	Merlot	Canelones
06Mt10	2006	Merlot	Canelones
06Mt11	2006	Merlot	Canelones
06Mt12	2006	Merlot	Canelones
06Mt13	2006	Merlot	Canelones
06Mt14	2006	Merlot	Canelones
06Ch	2006	Chardonnay	Canelones
06AV2	2006	Tannat	Canelones
06AV3	2006	Tannat	Canelones
06AV4	2006	Tannat	Canelones
06AV5	2006	Tannat	Canelones
06AV7	2006	Tannat	Canelones
06AVS20	2006	Tannat	Canelones
06CS1	2006	C. Sauvignon	Canelones
06SB1	2007	S. Blanc	Canelones
06SB2	2007	S. Blanc	Canelones
07TtD1	2007	Tannat	Canelones
07TtD2	2007	Tannat	Canelones
07TtD3	2007	Tannat	Canelones
08At1	2008	Tannat	Atlántida
08At2	2008	Tannat	Atlántida
08At3	2008	Tannat	Atlántida
08At4	2008	Tannat	Atlántida
09Tt1	2009	Tannat	Canelones
09Tt2	2009	Tannat	Canelones
09Tt3	2009	Tannat	Canelones
09Tt4	2009	Tannat	Canelones
09Tt5	2009	Tannat	Canelones
09Ca1	2009	Tannat	Canelones
09Ca2	2009	Tannat	Canelones
09Ca3	2009	Tannat	Canelones
09Ca4	2009	Tannat	Canelones
09Ca5	2009	Tannat	Canelones
09Ca6	2009	Tannat	Canelones
09Ca7	2009	Tannat	Canelones
09Ca8	2009	Tannat	Canelones
09Ca9	2009	Tannat	Canelones
09Ca10	2009	Tannat	Canelones

Cepa	Año	Variedad	Lugar
09Flo1	2009	Tannat	Florida
09Flo2	2009	Tannat	Florida
09Flo3	2009	Tannat	Florida
09Flo4	2009	Tannat	Florida
09Flo5	2009	Tannat	Florida
09Flo6	2009	Tannat	Florida
09Flo7	2009	Tannat	Florida
09Flo8	2009	Tannat	Florida
09Flo9	2009	Tannat	Florida
09Flo10	2009	Tannat	Florida
09Flo11	2009	Tannat	Florida
09Flo12	2009	Tannat	Florida
09Sa1	2009	Tannat	Sauce

Anexo 5

Cepa	CYA 15°C (cm)	CYA 25°C (cm)	CYA 37°C (cm)	Identificación
06Mt1	6,5	8,5	2,1	<i>A. uvarum</i>
06Mt2	7	8,5	2,4	<i>A. uvarum</i>
06Mt3	6,5	8,5	2,5	<i>A. uvarum</i>
06Mt4	6,5	8,5	2,8	<i>A. uvarum</i>
06Mt5	5	8,5	2,9	<i>A. uvarum</i>
06Mt8	6	8,5	3	<i>A. uvarum</i>
06Mt9	6,2	8,5	1,7	<i>A. uvarum</i>
06Mt10	4	8,5	2	<i>A. niger</i>
06Mt11	6	8,5	2,1	<i>A. uvarum</i>
06Mt12	4	8,5	8,5	<i>A. foetidus</i>
06Mt13	6,5	8,5	2,3	<i>A. uvarum</i>
06Mt14	6	8,5	3,5	<i>A. uvarum</i>
06Ch	6	8,5	2,5	<i>A. uvarum</i>
06AV2	4,5	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
06AV3	4	8,5	8,5	<i>A. foetidus</i>
06AV4	4,5	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
06AV5	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
06AV7	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
06AVS20	4,5	8,5	8,5	<i>A. tubingensis-like</i>
06CS1	3,9	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
07SB1	4,5	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
07SB2	4,5	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
07TtD1	3,9	8,5	8,5	<i>A. tubingensis like</i>
07TtD2	4	8,5	8,5	<i>A. foetidus</i>
07TtD3	4	8,5	8,5	<i>A. tubingensis like</i>
08At1	4,2	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
08At2	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
08At3	4,2	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
08At4	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Tt1	4,5	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Tt2	6,7	8,5	2,1	<i>A. uvarum</i>
09Tt3	5	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Tt4	3,7	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Tt5	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Ca1	6,5	8,5	2	<i>A. uvarum</i>
09Ca2	6,5	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Ca3	6	8,5	2,7	<i>A. uvarum</i>
09Ca4	6,5	8,5	3	<i>A. uvarum</i>
09Ca5	6,2	8,5	2,8	<i>A. uvarum</i>
09Ca6	6	8,5	2,7	<i>A. uvarum</i>
09Ca7	6	8,5	2,7	<i>A. uvarum</i>
09Ca8	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Ca9	6,5	8,5	2	<i>A. uvarum</i>
09Ca10	6,5	8,5	1,5	<i>A. uvarum</i>
09Flo1	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Flo2	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Flo3	3,7	8,5	8,5	<i>A. niger</i>

Cepa	CYA 15°C (cm)	CYA 25°C (cm)	CYA 37°C (cm)	Identificación
09Flo4	4,5	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Flo5	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Flo6	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Flo7	4,4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Flo8	6,5	8,5	2,5	<i>A. uvarum</i>
09Flo9	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Flo10	4,5	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Flo11	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Flo12	4	8,5	8,5	<i>A. niger</i>
09Sa1	6,3	8,5	1	<i>A. uvarum</i>

Anexo 6

Cepa	Identificación	CYA ng/g medio	YES agar ng/g medio
Mt1	<i>A. uvarum</i>	1.5	
Mt2	<i>A. uvarum</i>	< 0.8	
Mt3	<i>A. uvarum</i>	<0.5	
Mt4	<i>A. uvarum</i>	<0.9	
Mt5	<i>A. uvarum</i>	<1.2	
Mt8	<i>A. uvarum</i>	<1.0	
Mt9	<i>A. uvarum</i>	<0.9	
Mt10	<i>A. niger</i>	33.0	591.8
Mt11	<i>A. uvarum</i>	<1.2	
Mt12	<i>A. foetidus</i>	4.1	
Mt13	<i>A. uvarum</i>	<0.8	
Mt14	<i>A. uvarum</i>	<1.0	
Ch	<i>A. uvarum</i>	<1.0	
AV2	<i>A. niger</i>	9.6	1054.2
AV3	<i>A. foetidus</i>	48.3	1071.3
AV4	<i>A. niger</i>	1.3	1166.1
AV5	<i>A. niger</i>	10.9	1073.5
AV7	<i>A. niger</i>	47.9	845.0
AVS20	<i>A. tubingensis-like</i>	1.3	771.7
CS1	<i>A. niger</i>	1.3	745.9
SB1	<i>A. niger</i>	31.5	834.7
SB2	<i>A. niger</i>	41.9	884.1
TtD1	<i>A. tubingensis like</i>	1.0	737.9
TtD2	<i>A. foetidus</i>	9.2	882.1
TtD3	<i>A. tubingensis like</i>	1.3	612.8
At1	<i>A. niger</i>	96.3	
At2	<i>A. niger</i>	68.3	
At3	<i>A. niger</i>	109.6	
At4	<i>A. niger</i>	150.6	
09Tt1	<i>A. niger</i>	130.6	
09Tt2	<i>A. uvarum</i>	<0.8	
09Tt3	<i>A. niger</i>	1.3	
09Tt4	<i>A. niger</i>	1.6	
09Tt5	<i>A. niger</i>	1.4	
09Ca1	<i>A. uvarum</i>	<1.0	
09Ca2	<i>A. niger</i>	1.3	
09Ca3	<i>A. uvarum</i>	<1.2	
09Ca4	<i>A. uvarum</i>	4.1	
09Ca5	<i>A. uvarum</i>	<1.0	
09Ca6	<i>A. uvarum</i>	<1.2	
09Ca7	<i>A. uvarum</i>	<1.1	
09Ca8	<i>A. niger</i>	1.6	
09Ca9	<i>A. uvarum</i>	<1.0	
09Ca10	<i>A. uvarum</i>	<0.9	
09Flo1	<i>A. niger</i>	134.1	
09Flo2	<i>A. niger</i>	191.0	
09Flo3	<i>A. niger</i>	98.6	

Cepa	Identificación	CYA ng/gmedio	YES agar ng/g medio
09Flo4	<i>A. niger</i>	55.0	
09Flo5	<i>A. niger</i>	53.2	
09Flo6	<i>A. niger</i>	81.0	
09Flo7	<i>A. niger</i>	23.5	
09Flo8	<i>A. uvarum</i>	<1.1	
09Flo9	<i>A. niger</i>	4.7	
09Flo10	<i>A. niger</i>	53.5	
09Flo11	<i>A. niger</i>	1.4	
09Flo12	<i>A. niger</i>	4.2	
09Sa1	<i>A. uvarum</i>	<0.8	
10Ca1	<i>A. uvarum</i>	<1.0	

Anexo 7

Cepa	Identificación	IP 1	IP2	IP4	IP8	IP16	IP32
Mt1	<i>A. uvarum</i>						
Mt2	<i>A. uvarum</i>						
Mt3	<i>A. uvarum</i>						
Mt4	<i>A. uvarum</i>						
Mt5	<i>A. uvarum</i>						
Mt8	<i>A. uvarum</i>						
Mt9	<i>A. uvarum</i>						
Mt10	<i>A. niger</i>						
Mt11	<i>A. uvarum</i>						
Mt12	<i>A. foetidus</i>						
Mt13	<i>A. uvarum</i>						
Mt14	<i>A. uvarum</i>						
Ch	<i>A. uvarum</i>						
AV2	<i>A. niger</i>						
AV3	<i>A. foetidus</i>						
AV4	<i>A. niger</i>						
AV5	<i>A. niger</i>						
AV7	<i>A. niger</i>						
AVS20	<i>A. tubingensis-like</i>						
CS1	<i>A. niger</i>						
SB1	<i>A. niger</i>						
SB2	<i>A. niger</i>						
TtD1	<i>A. tubingensis like</i>						
TtD2	<i>A. foetidus</i>						
TtD3	<i>A. tubingensis like</i>						
At1	<i>A. niger</i>						
At2	<i>A. niger</i>						
At3	<i>A. niger</i>						
At4	<i>A. niger</i>						
09Tt1	<i>A. niger</i>						
09Tt2	<i>A. uvarum</i>						
09Tt3	<i>A. niger</i>						
09Tt4	<i>A. niger</i>						
09Tt5	<i>A. niger</i>						
09Ca1	<i>A. uvarum</i>						
09Ca2	<i>A. niger</i>						
09Ca3	<i>A. uvarum</i>						
09Ca4	<i>A. uvarum</i>						
09Ca5	<i>A. uvarum</i>						
09Ca6	<i>A. uvarum</i>						
09Ca7	<i>A. uvarum</i>						
09Ca8	<i>A. niger</i>						
09Ca9	<i>A. uvarum</i>						
09Ca10	<i>A. uvarum</i>						
09Flo1	<i>A. niger</i>						
09Flo2	<i>A. niger</i>						
09Flo3	<i>A. niger</i>						

Cepa	Identificación	IP1	IP2	IP4	IP8	IP16	IP32
09Flo4	<i>A. niger</i>						
09Flo5	<i>A. niger</i>						
09Flo6	<i>A. niger</i>						
09Flo7	<i>A. niger</i>						
09Flo8	<i>A. uvarum</i>						
09Flo9	<i>A. niger</i>						
09Flo10	<i>A. niger</i>						
09Flo11	<i>A. niger</i>						
09Flo12	<i>A. niger</i>						
09Sa1	<i>A. uvarum</i>						



Detección macroscópica de crecimiento *A. uvarum*.



Detección macroscópica de crecimiento agregado *A. niger*.

Cepa	Identificación	PRO32	PRO64	PRO128	PRO256	PRO512	PRO 1024
Mt1	<i>A. uvarum</i>						
Mt2	<i>A. uvarum</i>						
Mt3	<i>A. uvarum</i>						
Mt4	<i>A. uvarum</i>						
Mt5	<i>A. uvarum</i>						
Mt8	<i>A. uvarum</i>						
Mt9	<i>A. uvarum</i>						
Mt10	<i>A. niger</i>						
Mt11	<i>A. uvarum</i>						
Mt12	<i>A. foetidus</i>						
Mt13	<i>A. uvarum</i>						
Mt14	<i>A. uvarum</i>						
Ch	<i>A. uvarum</i>						
AV2	<i>A. niger</i>						
AV3	<i>A. foetidus</i>						
AV4	<i>A. niger</i>						
AV5	<i>A. niger</i>						
AV7	<i>A. niger</i>						
AVS20	<i>A. tubingensis-like</i>						
CS1	<i>A. niger</i>						
SB1	<i>A. niger</i>						
SB2	<i>A. niger</i>						
TtD1	<i>A. tubingensis like</i>						
TtD2	<i>A. foetidus</i>						
TtD3	<i>A. tubingensis like</i>						
At1	<i>A. niger</i>						
At2	<i>A. niger</i>						
At3	<i>A. niger</i>						
At4	<i>A. niger</i>						
09Tt1	<i>A. niger</i>						
09Tt2	<i>A. uvarum</i>						
09Tt3	<i>A. niger</i>						
09Tt4	<i>A. niger</i>						
09Tt5	<i>A. niger</i>						
09Ca1	<i>A. uvarum</i>						
09Ca2	<i>A. niger</i>						
09Ca3	<i>A. uvarum</i>						
09Ca4	<i>A. uvarum</i>						
09Ca5	<i>A. uvarum</i>						
09Ca6	<i>A. uvarum</i>						
09Ca7	<i>A. uvarum</i>						
09Ca8	<i>A. niger</i>						
09Ca9	<i>A. uvarum</i>						
09Ca10	<i>A. uvarum</i>						
09Flo1	<i>A. niger</i>						
09Flo2	<i>A. niger</i>						
09Flo3	<i>A. niger</i>						

Cepa	Identificación	PRO32	PRO64	PRO128	PRO256	PRO512	PRO1024
09Flo4	<i>A. niger</i>						
09Flo5	<i>A. niger</i>						
09Flo6	<i>A. niger</i>						
09Flo7	<i>A. niger</i>						
09Flo8	<i>A. uvarum</i>						
09Flo9	<i>A. niger</i>						
09Flo10	<i>A. niger</i>						
09Flo11	<i>A. niger</i>						
09Flo12	<i>A. niger</i>						
09Sa1	<i>A. uvarum</i>						



Detección macroscópica de crecimiento *A. uvarum*.



Detección macroscópica de crecimiento agregado *A. niger*.

